Karin Ullrich

Charakterisierung einer frühen temperatursensitiven Mutante von Adenovirus Serotyp 2

Diss München
1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546814_0013

1.Berichterstatter: Prof.Dr. E.-L. Winnacker

2.Berichterstatter: Prof.Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.7.1983

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Einführung	
1.2. Adenovirusinfizierte Zellen als Modellsystem für die Fertigstellung eukaryontischer translatierbarer RNA	10
1.2.1. Prozesse zur Fertigstellung translatierbarer RNA im Kern von Säugerzellen	11
1.2.1.1. Transkriptionsinitiation durch die Eukaryontenpolymerase II	11
1.2.1.1. "Cap"Formation	12
1.2.1.3. RNA Methylierung	12
1.2.1.4. PolyAAA Addition	12
1.2.1.5. Das Spleissen eukaryontischer Primärtranskripte und der Transport ins Zytoplasma	13
1.3. Frühe Funktionen im Adenovirusinfektionszyklus	20
1.4. Aufgabenstellung	27
2. Material	28
2.1. Abkürzungen	28
2.2. Zellen	30
2.3. Virusmaterial	30
2.4. Bakterien	30
2.5. Seren	30
2.6. Chemikalien und andere Materialien	30
2.7. Lösungen und Medien	33
3. Methoden	34
3.1. Zellkulturen	34
3.2. Kultivierung von Ad 2 und der temperatursensitiven Mutante H2ts206	34
3.2.1. Virusvermehrung in HeLa-Einschichtkultur	34
3.2.2. Virusvermehrung in Suspensionskultur	36

3.3. Extraktion viraler DNA aus isolierten Viruspartikeln 37
3.3.1. Gewinnung proteinfreier DNA 37
3.3.2. Extraktion viraler DNA mit dem kovalent gebundenen Protein 37
3.4. Charakterisierung viraler DNA-Synthese bei Wildtyp und Mutante 38
3.5. Sedimentationsverhalten viraler DNA 39
3.6. Plaquetests mit Ad2 und H2ts206 40
3.6.1. Plaquereinigung 40
3.7. Restriktionsendonukleasen 41
3.8. Fragmentierung von Adenovirus-DNA mit Restriktionsenzymen 41
3.9. Elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente 43
3.9.1. Trennung auf Agaroseflachgelen 43
3.9.2. Trennung auf Agaroserundgelen 43
3.10. Isolierung getrennter Fragmente 44
3.10.1. Isolierung aus Rundgelen speziell 44
3.11. Restriktive Transfektion von HeLa-Zellen mit viraler DNA 45
3.11.1. Auflösung des Ergebnisses in einem Folgeplaquetest 47
3.12. Marker-Rescue 47
3.13. RNA-Isolierung nach restriktiver Infektion 49
3.13.1. Infektionsbedingungen 49
3.13.2. RNA-Anreicherung 49
3.13.2.1. Anreicherung aus Kernen 50
3.13.2.2. Anreicherung aus dem Zytoplasma 52
3.14. In vivo ^{3}H-Markierung von RNA aus restriktiv infizierten Zellen 52
3.15. Hybridisierung filterimmobilisierter Ad2 DNA gegen virale RNA aus restriktiv infizierten Zellen 53

3.16. Flüssigkeitshybridisierungen 55
3.16.1. Nick-Translation 55
3.16.2. S_1Nukleaseverdauungen 55
3.16.3. Hybridisierung 57
3.17. Northern-Blot-Hybridisierungen 59
3.17.1. RNA-Auftrennung 59
3.17.1.1. Formaldehydgele 59
3.17.1.2. Glyoxalgele 60
3.17.2. Northern blot 61
3.17.3. Hybridisierung
3.18. Southern-Blot-Hybridisierungen 64
3.18.1. Auftrennung fragmentierter DNA 64
3.18.2. Southern blot 65
3.18.2.1. Denaturierung der DNA-Fragmente im Gel 65
3.18.2.2. DNA-Transfer 66
3.18.3. ^{32}P-5'-Markierung der RNA 66
3.18.3.1. Denaturierung der RNA 66
3.18.3.2. Polynukleotidkinase-Markierung 67
3.18.4. Hybridisierung 68
4. Ergebnisse 69
4.1. Vergleich des Viruswachstums von H2ts206 und Ad2 unter restriktiven und permissiven Bedingungen 70
4.1.1. Die plaquebildende Effizienz der Infektion 70
4.1.2. Optimale Bedingungen für die Restriktion 71
4.1.3. DNA-Synthese 74
4.2. Kartierung des Mutationsortes bei H2ts206 74
4.2.1. Restriktive Transfektion 74
4.2.1.1. Transfektionsverfahren 74
4.2.1.2. Sinnvolle DNA-Menge für Marker-Rescue-Versuche 77

4.2.2. Marker-Rescue-Ergebnis 79
4.3. Auswirkung der Mutation auf den Ablauf des Infektionszyklus 82
4.3.1. Mutante-induzierte RNA in Kern und Zytoplasma restriktiv infizierter Zellen 82
4.3.2. Flüssigkeitshybridisierungen 84
4.3.3. Hybridisierung gegen filtergebundene unfraktionierte RNA 85
4.3.4. Northern-Blot-Hybridisierungen 87
4.3.5. Southern-Blot-Hybridisierungen 91
5. Diskussion 98
5.1. Der Genotyp der Mutante H2ts206 98
5.2. Der Phänotyp von H2ts206 102
5.3. Mögliche Ursachen für den ts206-Phänotyp.Beziehung zum Mutationsort 109
6. Zusammenfassung 119
7. Literaturverzeichnis 122

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung: Die Adenovirusinfektion

Viren sind Zellparasiten ohne eigenen Stoffwechsel und ohne die eigenständige Fähigkeit zur Vermehrung ihrer genetischen Information.
Das Virusgenom ist stabilisiert in einer hochkomprimierten Proteinhülle, für deren Strukturelemente der grössere Teil seiner kodierenden Kapazität genutzt ist. Der andere Teil wird sofort aktiv wenn ein Viruspartikel -auf passivem Wege- in eine Eukaryontenzelle eingedrungen ist, mit der Folge, daß die vorhandenen Synthesebausteine und Synthesemechanismen oft nur noch zur Virusvermehrung genutzt werden.
Dabei laufen die zellulären Vorgänge zu Transkription, Translation und Replikation mechanisch im wesentlichen unverändert ab, nur ihre Substratspezifität ist, modifiziert von viralen Funktionen, speziell auf virale Bedürfnisse geprägt.
Dieser Umstand, zusammen mit der Tatsache, daß Viren sich außerordentlich produktiv vermehren und leicht isolierbar und manipulierbar sind, ließ ihnen eine Schlüsselstellung zukommen in der Erforschung des von ihnen genutzten zellulären Syntheseapparates.
So wie Bakteriophagen die Erforschung biochemischer und genetischer Zusammenhänge in der Prokaryontenzelle vorangetrieben haben, erweisen sich Eukaryontenviren in zunehmendem Maße als nützlich für das Verständnis der komplexeren Vorgänge in ihren "Wirtszellen". Der Einsatz viraler Mutanten und das Studium ihrer veränderten, oft unterbrochenen Infektionszyklen macht nicht nur virale Funktionen an Hand ihres Ausbleibens sichtbar und erlaubt, sie einem Ort auf dem viralen Genom zuzuordnen.

Oft können dadurch auch viral beeinflusste zelluläre Funktionen erst richtig erkannt und in ihre Teilschritte aufgelöst werden.
Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Viren,deren genetische Information im Zellkern transkribiert und repliziert wird.Sie bringen keine eigenen Enzyme in die Wirtszelle ein.Für die ersten Schritte im viralen Infektionszyklus wird also der unmodifizierte zelluläre Syntheseapparat genutzt.
Bis heute sind mehr als 80 verschiedene Serotypen dieses Virus aus Respirationstrakten unterschiedlicher Tierarten isoliert worden(Übersichtsartikel:Philipson et al., 1975,Wold et al.,1978).
Die menschlichen Adenoviren,von denen bisher mindestens 33 Serotypen bekannt sind,wurden zunächst nach ihren chemischen und biologischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt(Green und Pina,1964,Pina und Green, 1965,Hübner,1967).Später wurde diese Einteilung aufgrund von Hybridisierungsexperimenten,also nach dem Verwandtschaftsgrad der viralen DNA,auf 5 Gruppen erweitert(Green et al.,1979).

Gruppe	Vertreter	DNA-Homologie (%) in der Gruppe	DNA-Homologie (%) zu Vertetern anderer Gruppen	DNA (% G+C)	Onkogenität
A	12,18,31	48-69	8-20	47-49	hoch
B	3,7,11 14,16,21	89-94	9-20	49-52	mittel
C	1,2,5,6	99-100	10-16	57-59	niedrig
D	8,9,10, 13,15,17, 19,20 22-30	94-99	4-17	57-59	niedrig
E	4		4-23		niedrig

Tabelle 1:Vertreter der menschlichen Adenoviren nach Green et al.,1979

1.1.1. Der virale Infektionszyklus

Verteter der menschlichen Adenoviren sind im Ablauf ihres Infektionszyklus speziell eingestimmt auf die Bedingungen,die sie in menschlichen Zellen vorfinden. Nur in solchen Zellen kann eine Wechselwirkung der viruskodierten mit den zellulären Funktionen genauso erfolgen,daß Viruspartikel nach dem Muster des infizierenden"Agens" aus der Wirtszelle freigesetzt werden,mit der Möglichkeit andere gleiche Zellen zu infizieren.
Das heißt,die Information um die Art der Wirtsfunktionen,die vom Virus modifiziert und zur eigenen Vermehrung nutzbar gemacht werden,ist in der Struktur der viralen Funktionen,die für die Modifikation verantwortlich sind,enthalten. So können andere als die eigentlichen Wirtszellen entweder gar nicht oder nur zum Teil auf die Bedürfnisse des viralen Infektionszyklus eingestellt werden.
Im ersten Fall bleiben keine Spuren einer viralen Infektion in der Zelle zurück,die Infektion wird als abortiv bezeichnet.Im zweiten Fall,so zum Beispiel bei der Infektion von Affen- oder Hamsterzellen durch menschliche Adenoviren,kann es zur bleibenden Integration viraler Genombestandteile in der zellulären DNA kommen.In solchen Zellen kann ein Teil der Synthesekette im viralen Infektionszyklus noch verwirklicht werden.Es liegt aber immer an irgendeinem Punkt der Synthesekette eine zelluläre Funktion in einer Form vor,die zur Virusvermehrung nicht mehr,oder nur noch sehr mangelhaft genutzt werden kann.Der virale Infektionszyklus wird abgebrochen,es erfolgt keine oder eine drastisch eingeschränkte Virusfreisetzung. Man nennt eine solche Infektion unproduktiv,die entsprechenden Wirtszellen nicht permissiv für den

betroffenen Virustyp.Wirtszellen auf deren Eigenarten ein Virusvertreter so eingestellt ist,daß die Infektion in der,meist sehr effizienten, Proliferation infektiöser Partikel endet,nennt man permissiv für diesen Virustyp,eine solche Infektion produktiv oder lytisch.

Der lytische Infektionszyklus menschlicher Adenoviren beginnt mit der Adsorption der Viruspartikel an Rezeptoren der Zellmembran(Levine und Ginsberg, 1967,Svensson et al.,1981).Die Virionen werden in die Zelle aufgenommen,ihre Proteinhülle abgebaut und die verbleibenden "DNA-Proteincores" in einem aktiven Transportprozeß in den Zellkern eingeschleust(Chardonnet und Dales,1973,Luftig und Weihing,1975,Miles et al., 1980).Die in der Folge dort ablaufenden Syntheseprozesse, deren Sinn und Ende die Virusproliferation ist, werden definitionsgemäß in eine frühe und eine späte Phase unterteilt.

Der Eintritt in die späte Phase ungefähr acht Stunden nach Infektion ist charakterisiert durch den Beginn der viralen DNA-Synthese an den der Beginn der sogenannten späten Transkription gebunden ist(Übersichtsartikel:Persson und Philipson,1982).Die Syntheseaktivität in der späten Phase dient hauptsächlich der Erstellung viraler Strukturelemente in großer Zahl (ungefähr $5x10^5$ Partikel werden pro Zelle freigesetzt) und ist ungefähr 36 Stunden nach Infektion abgeschlossen. Mit dem Eintritt in die späte Phase ist die zelluläre Synthesemaschinerie selektiv auf Virusvermehrung eingestellt(siehe Abb.1).Zu diesem Zeitpunkt sind zelluläre DNA- und Proteinsynthese abgeklungen,und es werden keine zellulären RNAmoleküle mehr ins Zytoplasma transportiert.Die zelluläre RNA-Synthese dauert als einzige der wirtsspezifischen Synthesereaktionen an. 20% der GesamtRNA-Synthese in infizierten Kernen ist

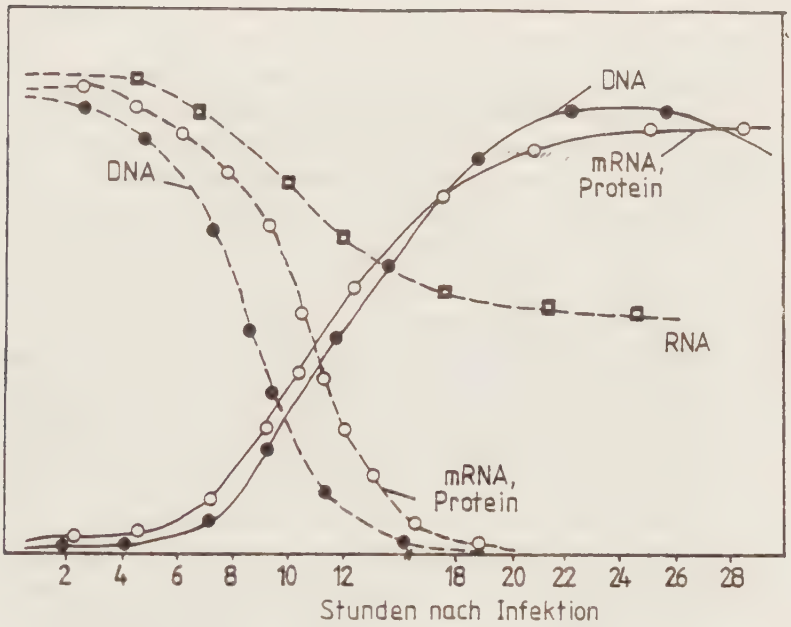


Abb.1: Synthese viraler(———) und zellulärer(-----) Makromoleküle im Verlauf des lytischen Infektionszyklus.

zu "späten" Zeiten nach Infektion virusspezifisch (Übersichtsartikel Adenovirustranskription:Nevins und Chen Kiang,1981).

Das Zustandekommen dieses Erscheinungsbildes ist katalysiert von viralen Funktionen,die in der frühen Phase des viralen Infektionszyklus exprimiert werden.

Die frühe Phase:

Etwa eine Stunde nach Infektion liegt das doppelsträngige lineare Virusgenom(36kbp),an dessen Enden kovalent ein virales Protein gebunden ist(Carusi,1977,Rekosh et al.,1977,Fütterer,1978) im Zellkern vor(Lonberg-Holm und Philipson,1969).Die DNA ist zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich nicht mehr vergesellschaftet mit viralen "Core-Proteinen" sondern mit zellulären Histonen(Tate und Philipson,1979,Sergeant et al.,1979)

und ist in dieser Form "Template" für die frühe Transkription und wohl auch für die Replikation.
Adenoviren bringen keine eigenen Enzyme in die Wirtszelle mit ein und kodieren auch nicht für eigene RNA-Polymerase- oder Translationsfunktionen. Lediglich eine DNA-Polymerase viralen Ursprungs wird beschrieben (Stillman et al., 1982).
Virale Transkription und Translation erfolgt also zunächst wohl durch die unveränderten zellulären Synthesemaschinerien dieser Funktion, nach zellulären Regulationsprinzipien. Die so verwirklichten viralen Gene bedingen dann nach und nach eine Umstellung zellulärer Syntheseaktivität selektiv auf virale Bedürfnisse.
Die frühen Transkriptionspromotoren werden nacheinander angeschaltet, erreichen verschiedene maximale Transkriptionsraten über eine unterschiedlich lange Zeit und werden teilweise mit Beginn der späten Phase abgeschaltet. Ein Teil der frühen Promotoren bleibt auch zu späten Zeiten nach Infektion aktiv (Übersichtsartikel: Ziff, 1980, Nevins und Chen Kiang, 1981).

VA RNA:
Während die frühe und späte Transkription der meisten viralen Funktionen von der zellulären RNA-Polymerase II verwirklicht wird, erscheinen in infizierten Zellen zwei kleine "virus-assoziierte" RNAs, die von der zellulären Polymerase III erstellt werden (VA RNAI und VA RNAII). Sie kodieren dicht nebeneinander im Bereich um 30% des viralen Genoms und sind ungefähr 150 Nukleotide lang (Söderlund et al., 1976, Mathews und Pettersson, 1978) (siehe auch Abb. 13). Sie werden zu frühen Zeiten in sehr geringem Umfang synthetisiert. Spät im Infektionszyklus wird die eine (VA RNAI) in großer Menge produziert, die Synthese der anderen (VA RNAII) dagegen eingestellt.

Wie anderen Polymerase III-Transkripten kann ihnen kein Protein zugeordnet werden,sie sind wenig modifiziert, ohne "Cap" am 5'-Ende und durchgehend komplementär zu ihrer kodierenden DNA Sequenz(Söderlund et al.,1976). Beide sind in PolIII-Transkriptionssysthemen in vitro in großer Menge herzustellen und ihre Sequenz ist bekannt(Wu,1978,Pan et al.,1977,Celma et al.,1977, Akusjärvi et al.,1980).Wie alle PolIII-Produkte haben sie eine intragene Promotorregion;zusätzlich kommt der 5'-flankierenden Sequenz eine Bedeutung für den Transkriptionsstart zu(Fowlkes und Shenk,1980).
Dem Rätsel um ihre Funktion ist man in der letzten Zeit durch verschiedene Arbeiten wesentlich näher gekommen. Ihre Bedeutung wurde zunächst diskutiert im Zusammenhang mit nuklearen Spleissvorgängen,für die sie,als das virale Gegenstück zellulärer U1 RNAs,eine Rolle spielen sollten.
VA RNA Homologien zu Spleisstellen nuklearer Präkursoren wurden zwar festgestellt,aber in geringerem Umfang als das bei den zellulären U1 RNAs der Fall war.
Yang et al. (1981) konnten in vitro Spleissvorgänge an Adenovirus-Primärtranskripten unterbinden,sobald sie dem Ansatz Antikörper zufügten,die RNA-Proteinkomplexe mit U1 RNA komplexieren.
Mathews (1980) konnte nachweisen,daß VA RNAs Basenpaarung mit später viraler mRNA eingehen,offenbar bevorzugt mit den "Leadersequenzen" an deren 5' Ende.
Mit Hilfe von Deletionsmutanten,die jeweils eine der beiden VA RNAs nicht exprimieren,kamen Thimmapaya et al.(1982) schließlich zu folgenden Befunden:
Die Rolle der VA RNAII ist entweder unwichtig für den Verlauf des Infektionszyklus oder kann von VA RNAI

vollständig übernommen werden.
Auch ohne VA RNAI treten normale Mengen viraler mRNA im Zytoplasma infizierter Zellen auf,die in in vitro Translationsansätzen effizient und genau exprimiert werden konnten.
VA RNAI scheint eher eine Bedeutung für die späte virale Translation zuzukommen.Eine auffällig verminderte virale Proteinsynthese nach Infektion mit der VA I^- Mutante war offenbar darauf zurückzuführen,daß Polysomenkomplexe mit später viraler RNA eine stark verringerte Zahl an Ribosomen enthielten.
VA RNAI ist also wohl wichtig für eine effiziente virusspezifische Wahrnehmung von RNA-Molekülen durch den zellulären Translationsapparat.

1.1.1.1. Die Bedeutung viraler Mutanten.

Die nicht permissive Infektion mit der Mutante eines Virustyps verläuft in einer eigentlich für diesen Virustyp permissiven Zelle im Prinzip ähnlich wie die Infektion eines Wildtypverteters in einer für ihn nicht permissiven Zelle.Das gilt besonders für solche Mutanten,die in einer der frühen viralen Funktionen gestört sind.
So stellen mutante-infizierte Zellen wichtige Systeme dar,in denen virale Funktionen aus verschiedenen Stadien des Infektionszyklus studiert werden können. Die biochemischen Folgen,die der Ausfall einer solchen Funktion in einer mutante-infizierten Zelle hervorruft,geben Aufschluß über die Wildtypfunktion des mutierten Gens und über den Zeitpunkt seines ersten Eingreifens im viralen Infektionsablauf.
Kartiert man den zugehörigen Mutationsort,dann läßt sich eine so definierte virale Funktion zusätzlich

einem Ort auf dem viralen Genom zuordnen.
Für eine solche Aufgabe sind konditionelle Mutanten geeignet wie temperatursensitive oder Wirtsbereichs-Mutanten.Sie lassen sich unter bestimmten,permissiven Bedingungen,also bei einer veränderten Temperatur oder in anderen Wirtszellen nach Wildtypmuster vermehren. Auf diese Weise erhält man genügend Mutantenmaterial, um dessen charakteristische Defekte dann anhand von Infektionen bei der nicht permissiven Temperatur, oder im nicht permissiven Wirtsbereich studieren zu können.
H2 ts206(temperatursensitive Mutante best. Kennummer abgeleitet vom menschlichen Serotyp 2) ist eine von zahlreichen frühen(DNA negativen) Adenovirusmutanten die heute beschrieben sind(Kathmann et al.,1976, Adenovirusübersichtsartikel:Persson und Philipson, 1981). H2 ts206 zeichnet sich durch einen Defekt in einer viralen Funktion aus,der sehr früh im viralen Infektionszyklus auftritt,etwa eine Stunde nach Infektionsbeginn.Betroffen sind aber weder die virale Adsorption noch das Eindringen der Viruspartikel in die Wirtszelle,da eine Infektion mit isolierter Mutanten-DNA den Mutantencharakter beibehält(Kathmann et al.,1976). Man kann also annehmen,daß die bei ts206 mutierte virale Funktion eine der ersten ist,die im Lauf des viralen Infektionszyklus exprimiert werden.
Den Phänotyp zu beschreiben,der nach nicht permissiver Infektion bei dieser Mutante auftritt und ihm möglichst genau einen Abschnitt auf dem viralen Genom zuzuordnen war Aufgabe dieser Arbeit.

1.2. Adenovirusinfizierte Zellen als Modellsystem für die Fertigstellung eukaryontischer translatierbarer RNA.

Im Kern von Säugerzellen erfolgt die DNA-abhängige RNA-Synthese durch drei Polymerasen,die sich durch die Art ihrer Produkte und durch ihre Substratspezifität(bezüglich der Erkennung von Initiationssequenzen) voneinander unterscheiden.Ihre Katalyse ist jeweils unterschiedlich hemmbar durch das Pilzgift α-Amanitin.
Pol I synthetisiert rRNA Präkursoren im Nukleolus insensitiv gegen α-Amanitinwirkung.
Pol II,im Nukleoplasma, ist verantwortlich für die Erstellung der Vorläufer translatierbarer RNA vom Genom zellulärer wie viraler DNA und ist leicht hemmbar durch α-Amanitin.
Pol III,ebenfalls im Nukleoplasma,ist hemmbar erst in Gegenwart höherer Konzentrationen an α-Amanitin und verantwortlich für die Synthese kleiner RNAs,denen kein Translationsprodukt zugeordnet werden kann.Dazu gehören die kleinen virusassoziierten RNAs und zelluläre tRNAs,5SrRNA,4,5SRNA und verwandte Spezies.
Die meisten Transkriptionsprodukte sind einer festen Reihenfolge modulierender Prozesse unterworfen ehe sie den Zellkern verlassen und ihrer jeweiligen Funktion gerecht werden können.Transkription und Modifizierung bis hin zum Transport"reifer" RNA Moleküle werden in homologer Weise vollzogen ,ob es sich nun um zelluläre oder virale genetische Information handelt.Die Katalyse erfolgt wohl auch in letzterem Fall durch zelluläre Enzyme,deren Substratspezifität von viralen Funktionen auf virale Bedürfnisse eingerichtet wird(Übersichtsartikel für Adenoviren: Nevins und Chen Kiang,1981).

Gerade am Modellfall adenovirusinfizierter Zellen wurde eines der wesentlichen charakteristischen Merkmale in der Entstehung eukaryontischer mRNA aufgedeckt,das Spleissen(Berget,Moore und Sharp, 1977,Chow et al.,1977,Klessig,1977,Dunn und Hussell, 1977,Lewis,Anderson und Atkins,1977,Chow et al.,1979, Broker und Chow,1979).

1.2.1. Prozesse zur Fertigstellung translatierbarer RNA im Kern von Säugerzellen.

Die Teilschritte der "RNA-Reifung" im Kern sind aufgeführt in der Reihenfolge,in der sie nacheinander stattfinden.

1.2.1.1.Transkriptionsinitiation durch die Eukaryonten-Polymerase II.

Ähnlich wie bei der Prokaryontentranskription sind eukaryontische Polymerase II-Promotoren durch eine gemeinsame TA-haltige Sequenz in fester Position vor dem eigentlichen Transkriptionsstart gekennzeichnet. Diese sogenannte TATAAA Homologiesequenz ist in vivo wie in vitro nötig für einen effizienten und genauen Transkriptionsstart und liegt etwa 30 Nukleotide in 5'-Richtung davon entfernt.(Goldberg,1979,Hen et al., 1982,Übersichtsartikel:Breathnach und Chambon,1981). Eine weitere Region um Position 70 vor dem Transkriptionsstart ist in vivo außerdem noch wichtig für eine effiziente Initiation(Benoist et al.,1980, Efstradiatis et al.,1980).Dieser Effekt ist in vitro nicht immer zu reproduzieren.
Adenovirespromotoren weisen als typische Polymerase II-Substrate beide regulatorisch bedeutsame Sequenzen auf(Hen et al.,1982,Übersichtsartikel:Nevins und Chen Kiang,1981).

1.2.1.2."Cap" Formation

An das 5'-Ende aller nascierender Pol II-Transkripte wird kurz nach dem Transkriptionsstart, möglicherweise gekoppelt an die Inkorporation des ersten Nukleotids, ein 7 Methyl-Guanylat in einer 5'5'Pyrophosphatbindung reagiert. Die resultierende Struktur spielt wohl eine Rolle für die Stabilität der mRNA und deren effiziente Translation im Zytoplasma (Manley et al., 1979, Babich et al., 1980, Hofer und Darnell, 1981).

1.2.1.3. RNA Methylierung

Die meisten zellulären und viralen Polymerase II-Transkripte enthalten interne m^6A Nukleotide (Shatkin, 1976). Die Methylierung erfolgt wahrscheinlich schon am nascierenden RNA-Strang (Chen Kiang et al., 1979). Für verschiedene Zellkulturen und einige Eukaryontenviren, darunter Adenovirus, sind eindeutige Homologiesequenzen um die methylierten Nukleotide gefunden worden (Wei et al., 1976, Schibler et al., 1977, Dimock und Stoltzfus, 1978, Canaani et al., 1979).

1.2.1.4. PolyAAA Addition.

Mit wenigen Ausnahmen erhalten alle Polymerase II-Produkte Minuten nach Beendigung der Transkription eine PolyAAA-Sequenz von 150-200 Nukleotiden angehängt an ihr 3'-Ende. Diese Stelle wird durch einen vorausgehenden endonukleotlytischen Schnitt erst bestimmt. In den meisten Fällen liegt, etwa 20 Nukleotide in

5'-Richtung davon eine sechs Nukleotide umfassende Homologiesequenz(AAUAAA)(Proudfoot und Brownlee,1976, Fraser und Ziff,1978,Hofer und Darnell,1981). Die PolyAAA Addition ist wahrscheinlich wichtig für die Stabilität der mRNA im Zytoplasma.Nach neueren Erkenntnissen hat sie keine Bedeutung für deren Transport aus dem Kern(Zeevi et al.,1981).

1.2.1.5.Das Spleissen
eukaryontischer Primärtranskripte
und der Transport ins Zytoplasma

Die Informationssequenz eukaryontischer DNA ist nicht kolinear mit der von ihr abgeleiteten Sequenz zytoplasmatischer mRNA und von Polypeptiden.Diese Diskrepanz,zuerst gefunden bei Adenovirus-DNA und Adenovirus-RNA,hat sich als gültig bestätigt für die meisten Eukaryontengene und ihre zytoplasmatischen RNA-Derivate (Übersichtsartikel Abelson,1979,Breathnach und Chambon, 1981).
Die Zwischenprodukte,über die diese Abweichung der RNA von ihrer kodierenden DNA-Sequenz erreicht wird, sind in groben Zügen bekannt(Smith und Lingrel,1978, Kinnigburgh,Mertz und Ross,1978,Blanchard et al.,1978, Tilghman et al.,1978).Die DNA wird zunächst in ein noch vollständig komplementäres,kolineares Primärtranskript umgeschrieben.Aus dem werden dann,in einem Deletions-Religierungsprozess die intervenierenden Sequenzen(Introns) entfernt und die später translatierten Sequenzen(Exons) direkt zusammengefügt.Alle enzymatischen Vorgänge dazu finden noch im Kern statt, vor dem Auftreten translatierbarer RNA im Zytoplasma (Nevins und Chen Kiang,1981).Zeitlich gesehen ist

der beschriebene Vorgang,das Spleissen nuklearer RNA,der letzte der Modifikationsschritte,denen Transkripte vor dem Verlassen der Kerne unterzogen werden.Es sind nur wenige Polymerase II-Produkte bekannt,zu deren Reifung kein Spleissvorgang gehört. Dazu zählen die RNA von Histon H1,von Tubulin und Aktin,der Seidenfibroine,Keratine und Interferone und einiger Eukaryontenviren,so z.B. die Hepatitis-virusRNAs und die RNA für Polypeptid IX als einzige der AdenovirusRNAs(Naora und Deacon,1982,siehe auch Abb.3).

Auch Transkriptionsprodukte der Eukaryontenpolymerasen I und III werden teilweise einem Spleissvorgang unterzogen.(Übersichtsartikel über Polymerase I-Produkte: Cech et al.,1982).

Von den bekannten Polymerase III-Transkripten werden lediglich etwa 10% der tRNAs gespleisst(Guthrie und Abelson,1982).

Außerdem ist auch ein Teil der mitochondrialen Primärtranskripte einem Spleissvorgang unterworfen(Übersichtsartikel:Borst und Grivell,1981 a und b).

Die Aufklärung biochemischer Vorgänge,die beim Spleissen der RNA wirksam werden,steht besonders für die Polymerase II-Produkte noch am Anfang.Man konnte bis heute lediglich eine minimale Sequenzhomologie an den Intron/Exon-Übergängen ausmachen,die allen Mosaikgenen gemeinsam ist.Sie ist hauptsächlich bestimmt durch ein Dinukleotid GU an den 5'Enden von Introns im resultierenden Primärtranskript und ein weiteres Dinukleotid AG an deren 3'Enden(Übersichtsartikel: Hamer und Leder,1979,Lewin,1980,Sharp,1981).Eine solche Homologie an wichtiger Stelle könnte bewirken,daß entsprechende DNA Sequenzen von einem-hypothetischen-Spleiss-Enzym-Komplex als Substrat erkannt werden.

Daß eine unspezifische Erkennung tatsächlich möglich ist,konnten Chu und Sharp(1981) zeigen,als sie einen Teil eines Mäuseglobingens und einen Teil des frühen SV 40 Genbereichs über ein "Chimärenintron" aus den Nahtstellen beider Gene fusionierten.Die so getrennten Exons unterschiedlicher Herkunft traten,korrekt gespleisst,als Ligierungsprodukt im Zytoplasma der infizierten Affenzelle auf.
Eine solche Erkennung könnte vermittelt werden durch eine der kleinen zellulären Kern-RNAs,die U1 RNA, die eine durchgehende Homologie zu den gemeinsamen Sequenzen an allen Intron/Exon-Übergängen aufweist; außerdem wird sie durch bestimmte Antikörper zusammen mit hochmolekularen nuklearen RNA-Protein-Komplexen ausgefällt(Lerner et al.,1980).Eine Analogie zu einem solchen Vorgang ist bei E.coli bekannt.
Da ist eine RNAase P,verantwortlich für endonukleolytische Schnitte bei der tRNA-Reifung,nur aktiv in Gegenwart ihres RNA-Kofaktors(Reed et al.,1982).
Da ein solcher Spleiss-Enzym-Komplex aber auch unterscheiden muß zwischen RNA-Sorten,die ja alle die Homologie gemeinsam haben,muß es zusätzliche variable Sequenzen geben,die potentielle Spleisstellen auf auf der RNA selektiv als Substrat erkennbar machen.
So geben einige Eukaryontengene in verschiedenen Differenzierungszuständen der Zelle ausgehend vom gleichen Primärtranskript zu verschiedenen mRNAs Anlass,die sich durch ihr Spleissmuster voneinander unterscheiden(Lewin,1980,Rozek und Davidson,1983).
Als homolog zu den Zuständen verschiedener Differenzierung in einer Zelle im Entwicklungsablauf eines Organismus sind die biochemischen Unterschiede anzusehen,die zwischen früher und später Phase in

virusinfizierten Zellen auftreten.
Auch in solchen Systemen kommt es vor,daß das gleiche Primärtranskript abhängig vom "Differenzierungszustand" der Zelle -also zu frühen oder späten Zeiten nach Infektion-unterschiedlich gespleisst wird.So ist z.B. das Spleissmuster der frühen und späten E3 und L1 RNAs in adenovirusinfizierten Zellen unterschiedlich (Nevins und Winkler,1981,Übersichtsartikel über Tumorvirus RNAProzessierung:Ziff,1980,über Adenovirus RNA-Prozessierung:Nevins und Chen Kiang,1981).
Im Verlauf viraler Infektionen gibt es aber auch den Fall,daß gleichzeitig eine Sorte Primärtranskript zu zu unterschiedlichen Produkten(mRNAs) gespleisst wird(s.Abb.2 Die allen Spleisstellen gemeinsamen Sequenzen am Rande der Introns bestimmen also wohl nur den Ansatzpunkt für den zugehörigen enzymatischen Mechanismus.Eine Funktion wie sie wahrscheinlich der TATAAA Box für den Transkriptionsstart und der AAUAAA Sequenz für die PolyAAA Addition zukommt.
Zusätzlich entscheiden dann variablere Regionen über Erkennung durch den zugehörigen Enzymkomplex in jeweils der Konformation,die er in verschiedenen Differenzierungsstadien einnimmt; oder auch über die unterschiedliche Affinität eines solchen Komplexes zu verschiedenen potentiellen Spleisstellen im selben Differenzierungsstadium.
Für die Transkriptionsinitiation sind solche zusätzlichen Bereiche auf der DNA bereits untersucht(Benoist et al., 1980,Efstradiatis et al.,1980).Was den Spleissvorgang angeht weiß man,daß zusätzlich zu den Bereichen allgemeiner Homologie am Rande der Introns benachbarte Regionen im Intron,20 oder sogar 705 Nukleotide von der Spleisstelle entfernt,von Bedeutung sind (Busslinger et al.,1981,Fukumaki et al.,1982, Dobkin et al.,1983).

Außerdem gibt es beim ß-Globin-Gen Spleisstellen, die unterschiedlich starke Signale für die Spleissmaschinerie darstellen und ihre Wahrnehmung zum Teil gegenseitig bedingen(Treisman et al.,1982).

Die auffällige Homologie an Intron/Exon-Übergängen der Polymerase II-Produkte existiert nicht bei Pol I-und Pol III-Primärtranskripten, auch wenn sie ebenfalls einem Spleissvorgang unterzogen werden.In diesem Fall erfolgt die Selektion zytoplasmatischer Sequenzen wohl auf anderem Wege als bei den Pol II-Transkripten.Über die Biochemie des Spleissvorganges ist hier schon wesentlich mehr bekannt als bei proteinkodierenden RNA-Präkursoren.
So konnten Kruger et al.(1982)zeigen,daßdie intervenierende Sequenz eines rRNA-Primärtranskripts in vitro in Gegenwart mono-und divalenter Kationen und eines Guanosin-Kofaktors richtig herausgeschnitten und und die Exons ebenso richtig wieder ligiert werden. Da in diesem Ansatz kein Protein oder eine andere RNA zugegen waren ist anzunehmen,daß der rRNA-Präkursor in einer bestimmten Konformation die Eigenkatalyse des Spleissvorganges bewerkstelligen kann.
Im Gegensatz dazu steht der Befund,daß bei mitochondrialen Spleissvorgängen viele trans-aktive Faktoren am RNA-Substrat wirksam werden.Diese Faktoren sind zum Teil auf den herauszuschneidenden Introns selbst(Maturasen),zum Teil von nuklearen Genen kodiert(Anziano et al.,1982,Bertrand et al.,1982).Zusätzlich zur Aktion der Maturasen scheinen bei saccharomyces cerevisiae die mitochondrialen Ribosomen selbst einen Einfluß auf den Spleissvorgang zu haben(Schmelzer und Schweyen,1982).

Bei tRNAs ist der Spleissmechanismus bis heute am besten charakterisiert.Er kann naturgetreu in vitro nachvollzogen und auch mit Hilfe von Mutanten studiert werden(O'Farrell et al.,1978,Knapp et al., 1978).Hier sind RNA-Zwischenprodukte der Deletions- und Religierungsprozesse bekannt.Eine zugehörige Endonuklease ist angereichert und als integraler Bestandteil der Kernmembran lokalisiert(Peebles et al.,1983),auch eine Ligase mit Spezifität für Enden von tRNA-Exons ist teilweise gereinigt (Greer et al.,1983).Es ist also wahrscheinlich,daß der tRNA-Spleissvorgang an der Kernmembran in enger örtlich und zeitlicher Koppelung an den Transport stattfindet.Dafür,daß eine solche Koppelung auch bei den proteinkodierenden Polymerase II-Transkripten gültig ist,gibt es einige Evidenz.

Zunächst wird der Spleissvorgang an Transkripten vollzogen,die schon alle anderen Prozessierungsstufen durchlaufen haben,also als zeitlich letzter der Prozessierungsschritte vor dem Transport.
Außerdem ist kein Fall bekannt,in dem eine ungespleisste MosaikRNA das Zytoplasma erreicht hätte.Falsch gespleisste RNAs dagegen werden effektiv transportiert. Das ist zum Beispielfür fehlerhaftes Spleissen der ß-Globin-Transkripte beschrieben(Busslinger et al.,1981), oder auch in Systemen,in denen virale Transkripte fehlerhaft gespleisst werden,so z.B. die Fiber-mRNA in nicht permissiv mit Adenoviren infizierten Affenzellen(Klessig und Chow,1980).
Hamer et al.(1979) haben SV 40-Rekombinanten erstellt bei denen ein Teil der viralen späten Region durch einen Teil des ß-Globin Gens ersetzt ist.Enthält das rekombinierte Gen und damit das Primärtranskript

die SV40-Spleisstellen,so wird eine Chimären-mRNA ins Zytoplasma transportiert und sogar translatiert.Sind die Spleisstellen bei der Rekombination deliert worden,so ist die RNA im Kern instabil und ein Schluß auf die Transportierbarkeit einer solchermassen spleisstellenfreien RNA nicht möglich. Es gibt aber Beispiele aus denen hervorgeht,daß Primärtranskripte,deren Intron/Exon-Übergänge zwar erhalten sind,aber aus irgendeinem Grund nicht wahrgenommen werden,im Kern akkumulieren,also nicht transportiert werden.So zum Beispiel in einem Fall von ß-Thalssämie,bei der das Spleissen der ß-Globin Introns stark unterdrückt ist und im selben Umfang die ungespleissten Präkursoren im Kern akkumulieren(Busslinger et al.,1981).In bestimmten, nicht permissiv mit SV 40 infizierten Teratokarzinomazellen unterbleibt das Spleissen viraler Transkripte und es ist auch keine virale RNA im Zytoplasma nachweisbar(Segal et al.,1979).Schliesslich konnten Montell et al.(1982)zeigen,daß eine Mutation am Intron/Exon-Übergang eines der Ad2 E1A-Transkripte nicht nur dessen Spleissung,sondern auch seinen Transport verhindert.
Transport findet also nicht ohne Spleissvorgang statt (mit Ausnahme der Transkripte,deren natürliche Gene keine intervenierenden Sequenzen enthalten). Der Spleissvorgang ist nicht nur der zeitlich letzte der Prozessierungsschritte vor dem Transport, sondern wohl auch eine notwendige Voraussetzung für ihn.

1.3. Frühe Funktionen im Adenovirusinfektionszyklus

In der frühen Phase des Infektionszyklus,also vor Beginn der viralen Replikation,wenn zelluläre Transkription und Translation noch unbeeinträchtigt aktiv sind,ist der virusspezifische Anteil an diesen Prozessen verschwindend gering:
Frühe virale RNA-Synthese im Kern adenovirusinfizierter Zellen macht 0.1 bis 0,2 Prozent der Gesamtsynthese aus,dieser Anteil steigt zu späten Zeiten nach Infektion auf etwa 20%(Übersichtsartikel Nevins und Chen Kiang,1981). Außerdem ist frühe virale RNA wesentlich weniger stabil als solche,die spät im Infektionszyklus synthetisiert wird oder als zelluläre RNA(Wilson et al.,1979, Babich und Nevins,1981).Die Gleichgewichtsmenge viraler RNA im Kern infizierter Zellen macht zu frühen Zeiten nach Infektion also nur einen Promillebruchteil an der Gesamtmenge aus.
Früh im lytischen Adenovirusinfektionszyklus wird RNA ausgehend von sechs viralen Promotoren,wahrscheinlich durch die zelluläre Polymerase II, synthetisiert (Übersichtsartikel:Persson und Philipson, 1981, siehe auch Abbildung 2).Diese Promotoren werden kaskadenartig,in fester Reihenfolge hintereinander unterschiedlich stark und über verschiedene Zeiträume aktiv(Reihenfolge:Nevins et al.,1979):

A) E1A (early region 1A)

Zuerst,ungefähr eine Stunde nach Infektion,wird die E1A Region aktiviert,deren Transkription dann über sechs Stunden anhält.Produkte,die hier kodieren haben unter anderem eine Funktion bei der Transformation und der Regulation anderer früher Produkte.

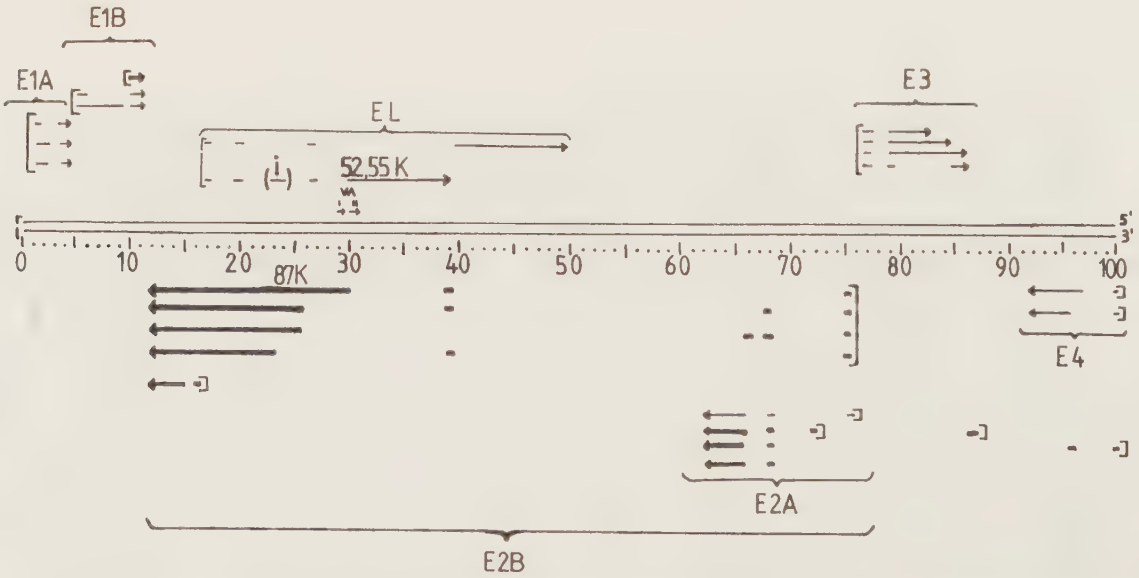


Abb.2: Genkarte früher,Ad2-kodierter mRNA-Sequenzen(Exons) und einiger ihrer Proteine. Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an.Die Position der Promotoren ist durch senkrechte Klammern bezeichnet.Waagerechte Klammern fassen Transkriptionseinheiten einer Region zusammen.Zugeordnete Proteine,soweit sie aufgeführt sind,sind durch ihr Molekulargewicht vertreten(K=1000d).Verstärkte Linien kennzeichnen Regionen,die hauptsächlich nach Beginn der Replikation exprimiert werden.

B) EL (early-late region)

Dann wird das frühe Transkript,ausgehend vom "späten" Promotor bei Position 16,3 auf dem viralen Genom, angeschaltet.Im Gegensatz zur späten Transkriptionseinheit von diesem Promotor erstreckt sich die frühe Synthese von dort nur bis zum Ende der L3 Region (late region 3) bei Position 60 (Nevins und Wilson,1981,siehe auch Abbildung 14). Die Transkriptionsrate bleibt im Rahmen anderer früher Werte.Präkursoren,ausgehend vom späten Promotor für die frühen Regionen "L1,2 und 3",eigentlich richtiger EL 1,2 und 3,treten dabei aequimolar auf. Im Zytoplasma werden zu frühen Zeiten aber nur mRNA-Transkripte der L1 und L2 Region gefunden (Nevins und Wilson,1981).
Im Gegensatz zu späten Verhältnissen gibt es zu frühen Zeiten im Zytoplasma nur ein Spleissprodukt der L1 Region,daß sich außerdem im Spleissmuster von den späten L1 Produkten unterscheidet(Nevins und Wilson,1981).Ihm werden Proteine von 52 und 55 kd zugeordnet(Akusjärvi und Persson,1981).
Ein Teil dieser frühen zytoplasmatischen Transkripte enthält zusätzlich zum "späten" dreiteiligen Leader-Segment einen sogenannten "i"-Leader,der um Position 22 bis 23,2 kodiert(Chow et al.,1979).
Möglicherweise entsteht ausgehend von diesem "i"-Leader-Segment ein weiteres Translationsprodukt früher L1mRNA,ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 14 kd(Akusjärvi und Persson,1981).

C) E3 und E4

Danach werden die Regionen E3 und E4 mit einem Maximum bei zwei bis drei Stunden nach Infektion

transkribiert.Ihre Synthese lässt in den folgenden vier Stunden nach und wird eingestellt.

D) E2A

Spät im frühen Teil des viralen Infektionszyklus kommt die Region E2A zur Expression.Ihr Tanskriptionsmaximum liegt bei sieben Stunden nach Infektion.In der späten Phase lässt die Synthese von dieser Region nach. Außerdem geht dann ausgehend von einem anderen Promotor (von Position 72 anstelle von 75) der Hauptinformation ein anderes Leader Segment voraus.Translationsprodukt der E2A Region ist ein 72kd oder "DNA-bindendes" Protein,das sehr vielen Funktionen im viralen Infektionszyklus gerecht wird.Es ist nötig für Replikations-Initiation und Elongation und hat einen negativ regulierenden Einfluß auf die Transkription von der Region E4.Eine ts Mutation,die im Bereich des 72 kd Proteins kodiert,hat außerdem zur Folge,daß alle viralen mRNA-Transkripte eine um ein Vielfaches erhöhte Stabilität aufweisen.Ihre Syntheserate erscheint dabei unverändert(Babich und Nevins,1981).

E) E1B

Auch die E1B Region wird erst gegen Ende der frühen Phase exprimiert.Ihre Transkriptionsrate bleibt dann über den Verlauf der gesamten Infektion konstant; mRNA aus dieser Region scheint nach Beginn der Replikation wesentlich stabiler zu sein als noch in der der frühen Phase.Dem E1B Bereich sind Translationsprodukte von 15 und 58 kd zugeordnet worden.Zusammen mit E1A Funktionen,kodiert ebenfalls vom äußersten linken Ende des viralen Genoms ,sind die E1B Funktionen notwendig und hinreichend zur Transformation nicht permissiver Wirtszellen.

F) E2B

Die E2B Region wird intermediär exprimiert,das heißt überwiegend zu späten Zeiten im Infektionszyklus,aber unabhängig vom Beginn der viralen DNA Replikation. Das Primärtranskript wird ausgehend von der Region des frühen E2A Promotors bei Pos.75 erstellt.Es umfasst einen Bereich bis zu Pos.10 von dort. Eines der Translationsprodukte von dieser Region ist ein 87 kd Vorläuferprotein des 55kd Proteins das kovalent gebunden an den Enden der DNA in Virionen vorliegt.Für das Vorläuferprotein wird eine Rolle bei der Initiation der viralen Replikation diskutiert(Übersichtsartikel:Winnacker,1983). Die Entdeckung eines weiteren E2B Translationsproduktes, einer viruskodierten DNA Polymerase,hat in der letzten Zeit für Diskussionsstoff gesorgt(Stillman et al.,1982,Friefeld et al.,1983).

InAnalogie zu entsprechenden Versuchen bei Prokaryonten sind Experimente mit Proteinsyntheseinhibitoren (PSI),eingesetzt vor oder zum Beginn der Infektion, durchgeführt worden.Auf diese Weise lässt sich unterscheiden zwischen Funktionen,die vom unveränderten Wirtsmechanismus exprimiert werden und solchen Funktionen, deren Expression schon von viralen Translationsprodukten -notwenig aus der ersten Gruppe- geleitet wird. Für Adenoviren hat sich gezeigt,daß in Gegenwart von PSI von Beginn der Infektion an die virale Transkriptionsrate unverändert bleibt und virale mRNA-Transkripte und Proteine vollständig erscheinen,wenn auch in reduziertem Umfang(nur E1A mRNA ist offenbar von dieser Reduktion nicht betroffen)(Lewis und Mathews,1980, Akusjärvi und Persson,1981).

Demnach hatte es den Anschein,als sei die erste virale Funktion,die Einfluß auf den Infektionszyklus nimmt verantwortlich für erhöhte Stabilität oder einen effektiveren Transport viraler mRNA.
Ein solcher Befund stand aber in krassem Widerspruch zu Ergebnissen über die Bedeutung der E1A Region:
Die E1A Region ist demzufolge nicht nur die erste der viralen Funktionen die exprimiert wird.Ihr konnte auch, -abweichend vom "PSI Phänotyp"- mit Hilfe von Deletions- und Punktmutanten eine eindeutige Wirkung im Infektions zyklus zugeordnet werden(Jones und Shenk,1979, Berk et al.,1979):
Bei niedriger Multiplizität der Infektion(m.o.i.) mit den Mutanten traten keine viralen mRNA Transkripte im Zytoplasma auf,mit Ausnahme der mutierten E1A RNA bei der Punktmutante.
Übte die E1A Funktion ihre Wirkung auf die anderen viralen Promotoren nicht als Protein,sondern vielleicht als RNA aus? Klärung in diesem Punkt sollten Versuche mit Proteinsyntheseinhibitoren während der Infektion mit der E1A Deletionsmutante dl 312 schaffen.Die erzielten Ergebnisse waren aber sehr uneinheitlich und schwer zu interpretieren bis sich zeigte,daß die Expression der Mutation stark mit der Multiplizität der Infektion variierte.
Bei sehr hohen Multiplizitäten zeigte sich eine Wild-typinfektionsrate und Wildtypwachstum,wobei alle resultierenden Viruspartikel immer noch die E1A Deletion aufwiesen(Shenk et al.,1979).
Bei einer Infektion von 50 bis 100 pfu/Zellle,wie sie in den meisten Labors durchgeführt wird,waren keine viralen mRNA-Transkripte im Zytoplasma nachzuweisen.
Die virale Transkription der frühen Regionen erfolgte

zwar,aber in drastisch reduziertem Umfang(Jones und Shenk,1979).
Nevins (1981)konnte zeigen,daß der Effekt der E1A Mutation nur aufgelöst wird bei Anwendung niedriger (10-20 pfu/Zelle)Multiplizitäten der Infektion.
Unter diesen Bedingungen lässt sich auch ein sinnvoller Bezug zu den PSI-Versuchen herstellen:
Bei niedriger m.o.i. mit dl 312 erfolgt keine Transkription viralen Ursprungs im Kern infizierter Zellen - auch keine frühe Synthese ausgehend vom "späten" Promotor.
Erfolgt eine solche Infektion in Gegenwart von PSI von Beginn an,so erscheint die virale Transkription unverändert im Vergleich zum Wildtypzustand ohne PSI, lediglich der mRNA-Spiegel ist reduziert.
Die Mutation hat demnach eine negative Auswirkung auf die Transkriptionsinitiation von den übrigen viralen Promotoren. Dieser"E1A Effekt" wird in Gegenwart von Proteinsyntheseinhibitoren völlig kompensiert.
E1A Funktion und PSI erzielen also genau dieselbe Wirkung.
So ist es wahrscheinlich,daß beide die Expression eines sehr kurzlebigen,zellulären Proteins verhindern,das seinerseits eine Repression der frühen viralen Promotoren mit Ausnahme des E1A Promotors bewirkt.
PSI blockieren dabei auf der Ebene der Translation die Entstehung des zellulären Repressors,das E1A Protein verhindert wahrscheinlich dessen Transkription (sonst wäre von einem Protein in so geringer Menge nicht eine gleiche Wirkung zu erzielen wie durch PSI).
Damit wird auch wahrscheinlich,daß der sichtbare Effekt, den Proteinsyntheseinhibitoren auf eine Wildtypinfektion ausüben -das reduzierte Auftreten viraler mRNA im Zytoplasma- auf den Ausfall eines anderen sehr frühen viralen Proteins zurückzuführen ist.

1.4. Aufgabenstellung

Es war Aufgabe dieser Arbeit den "früh" im Infektionszyklus wirksamen Defekt einer temperatursensitiven Mutante von Adenovirus Typ 2 ,H2ts206, geno- und phänotypisch zu charakterisieren.

2. Material

2.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ad x	Adenovirus Typ x
Ci	Curie (1Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute
$C_{ts,wt}$	RNA, isoliert zu frühen Zeiten aus dem Zytoplasma restriktiv mit H2ts206 oder Ad2 infizierter HeLa-Zellen
dl x	virale Deletionsmutante Nr.x
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ds DNA	doppelsträngige DNA
E_{1-4}	früh im Infektionszyklus verwirklichte Regionen auf dem Adenovirusgenom
EL	früh verwirklichte Region auf dem Adenovirusgenom, transkribiert ausgehend vom "späten" Promotor bei Pos.16,3
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyaethylpiperazin-N'-2-aethansulfonsäure
hnRNA	Kern-RNA
H x ts y	temperatursensitive Mutante Nr.y des menschlichen Adenovirus Typ x
$K_{ts,wt}$	RNA, isoliert zu frühen Zeiten aus dem Kern restriktiv mit H2ts206 oder Ad2 infizierter Zellen
kd	Kilodalton
KOac	Kaliumazetat
L_{1-5}	spät im Infektionszyklus verwirklichte Regionen auf dem Adenovirusgenom

Min	Minute
mock-Infektion	Kontrollversuch,Behandlung der Zellen wie zur Infektion,nur ohne Virusmaterial
m.o.i.	Multiplizität der Infektion(pfu/Zelle)
mRNA	Boten-RNA
NaOac	Natriumazetat
NP 40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Aethansulfonsäure)
pfu	plaquebildende Einheiten
Pol I,II,III	hier:eukaryontische RNA-Polymerasen TypI,II, und III
Pos.	Position,hier:auf der Einteilung des linearen Ad2-Genoms von 1 bis 100
Prot K	Proteinase K
PSI	Proteinsyntheseinhibitoren
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ts	temperatursensitiv
ts 206	H2 ts206
UpM	Umdrehungen pro Minute
VA RNA	Adenovirus-assoziierte RNA
wt	wildtyp-
ø	Durchmesser

2.2. Zellen

HeLa-Zellen waren ein Geschenk von Dr.Williams, Glasgow.

2.3. Virusmaterial

Adenovirus Typ 2 war ursprünglich von Dr.W.Rowe, NIH,Bethesda,Maryland,USA erhalten worden.
H2 ts206 stammte von Dr.P.Kathmann,Institut für Genetik,Köln.

2.4. Bakterien

Streptomyces albus-Stämme wurden von The American Type Culture Collection,Rockville,Maryland,USA bezogen.

2.5. Seren

Flow Laboratories,Bonn:Kälber-,Pferdeserum

2.6. Chemikalien und andere Materialien

Bezugsfirmen:

Amersham und Buchler,Braunschweig
5'-(γ)^{32}P-Adenosin-5'-Triphosphat (^{32}P-ATP),(3000 Ci/mMol),
5-^{3}H-2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat (^{3}H-CTP),(20-40 Ci/mMol),
^{32}P-Orthophosphat,(30-100 Ci/mg),6-^{3}H-Thymidin,(22-30 Ci/mMol),
5,6-^{3}H-Uridin,(40-60 Ci/mMol).

J.T.Baker Chemical Co,Philipsburg,New Jersey,USA
Cesiumchloride,glycerol,toluene.

Bio-Rad Laboratories,Richmond,California,USA
Hydroxylapathit,Mischbettionenaustauschermaterial.

Böhringer,Mannheim
2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat (dATP),2'-Desoxyguanosin-5'-Triphosphat (dGTP),2'-Desoxythymidin-5'-Triphosphat (dTTP),DNA-PolymeraseI,Kalbsthymus-DNA,Lachssperma-DNA,Polynukleotidkinase,RNAase A, S_1-Nuklease.

Flow Laboratories,Bonn
Gentamycin.

Fluka AG,Buchs,SG
Formamid.

E.Merck AG,Darmstadt
Aethanol,Aethylendinitrilotetraessigsäure(EDTA), Ammoniumazetat,Bromphenolblau,Chloroform,Dimethylsulfoxid(DMSO),Essigsäure,Ethidiumbromid,Formaldehyd, Glycin,Glyoxal,Isoamylalkohol,Isopropanol,Jodoazetat, Kaliumazetat,Methanol,Natriumazetat,Natriumdodecylsulfat(SDS),Neutralrot,Phenol,Proteinase K aus Pilzen, Trichloressigsäure(TCA),Triton X-100,
sowie alle verwendeten anorganischen Salze,Säuren und Basen.

New England Bio Lab,Cabot St.,Beverly,MA,USA
Restriktionsendonukleasen: BamHI,EcoRI,HindIII,HpaI, XhoI.

Pharmacia Fine Chemicals,Uppsala
Sephadex G50.

C.Roth,Karlsruhe
Dithiothreitol

Schleicher§Schüll GMBH,Dassel,Kreis Einbeck
Nitrozellulosefilterpapier BA85,Porengrösse 0,45um,
Nitrozelluloserundfilter, ⌀ 25mm,Porengrösse 0,2um.

Schwarz und Mann,Orangeburg,New York,USA
Guanidiniumhydrochloride(GuHCl),Sucrose ultrapure.

Serva,Heidelberg
N-2-Hydroxyaethylpiperazin-N'-2-Aethansulfonsäure(HEPES),
Natriumsarkosyl,Piperazin-N,N'-bis(2-Aethansulfonsäure)(PIPES),Polyvinylpyrrolidon,Trichlortrifluoraethan
(Freon 113),Visking Dialyseschläuche.

Sigma Chemie GMBH,München
Agarose,Dextransulfat,Ficoll,Heparin,Morpholinopropansulfonsäure(MOPS),Nonidet P40(NP40),Rinderserumalbumin(BSA),Spermidin,Streptomycinsulfat,
tRNA aus Hefe,Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan(Tris).

Whatman Ltd.,Springfield Mill,Maidstone,Kent.,USA
Glasfilter GF/A und GF/C,3MM Papier,Phosphozellulose P11.

Worthington Biochem.Corp.,Freehold,N.J.,USA
DNAaseI(RNAasefrei).

Zinsser,Frankfurt
Quickscint 501.

2.7. Lösungen und Medien

BND-A-Puffer: 250mM NaCl, 10mM Tris,pH8,
5mM EDTA,pH8.
Borat-Puffer: 50mM Dinatriumtetraborat,
20mM EDTA,pH8.
Dulbecco's Medium: beschrieben bei Dulbecco
und Freeman(1959).
Eagle's Medium(abgewandelt): beschrieben bei
Winnacker(1975).
HEPES-gepufferte Salzlösung: beschrieben bei
Graham und van der Eb(1973), (HeBS).
SSC(1x): 150mM NaCl, 15mM Natriumcitrat.
Szintillationsflüssigkeit: 50g PermablendIII,
5l Methanol, 5l Toluol.
TE-Puffer: 10mM Tris,pH7,5, 1mM EDTA,pH8.
TN-Puffer: 10mM Tris,pH7,5, 50mM NaCl.
Tris-gepufferte Salzlösung: beschrieben bei
Winocour(1963).

Nicht eigens aufgeführte Lösungen sind im Methodenteil zusammen mit dem jeweils relevanten Verfahren beschrieben.

3. Methoden

3.1. Zellkulturen

HeLa-Zellen für die Virusvermehrung wurden in Einschicht- und Suspensionskultur gezüchtet. Als Nährlösungen fanden Verwendung: Dulbecco's Medium (Dulbecco und Freeman, 1959) für die Einschichtkultur und ein abgewandeltes Eagle's Medium (Winnacker, 1975) für die Suspensionskultur. Beide wurden 10%ig versetzt mit Kälberserum und mit 50 µg/ml Gentamycin, letzteres um einer Kontamination durch Mykoplasmen vorzubeugen. Die Zellpassage erfolgte wie bei Kathmann (1974) beschrieben.

3.2. Kultivierung von Adenovirus Typ 2 und der temperatursensitiven Mutante H2 ts206

3.2.1. Virusvermehrung in HeLa-Einschichtkultur

In Falkonflaschen gezüchtete, beinahe konfluente HeLa-Zellrasen (etwa 2×10^6 Zellen pro Flasche) wurden mit einem Gemisch (1/1) aus Tris-gepufferter Salzlösung und Dulbecco's Medium gewaschen, mit der Viruslösung versetzt (50 bis 100 pfu/Zelle im Fall einer Wildtyp-, 0,1 bis 1 pfu/Zelle bei Mutanteninfektion) und bei 37°C 50 Minuten lang inkubiert. Nach der Adsorptionszeit wurde die Viruslösung abgegossen und durch 40 ml einer Nährlösung (2%ig an Kälberserum) ersetzt. Anschließend wurde mit einem CO_2/Luft-Gemisch begast und die Inkubation bis zum Auftreten eines deutlich sichtbaren zytopathischen Effektes fortgesetzt. Im Fall

der Wildtypinfektion waren das 36 bis 40 Stunden bei 37°C.Für die Mutante betrug die entsprechende Inkubationszeit bei der permissiven Temperatur(32°C) etwa 5 bis 7 Tage.
Zur Virusisolierung wurde dann das Medium abgegossen,einmal mit Tris-gepufferter Salzlösung gewaschen, und die Zellen in 1,5 ml einer 0,02M Tris-Salzlösung bei -80°C eingefroren.Beim Wiederauftauen lösen sich die Zellen nach leichtem Schütteln ab und können in Suspension abpipettiert werden.Anschließende Ultraschallbehandlung(vier mal 30 Sekunden,50mA, Branson Sonifier,dazwischen je eine Minute Pause) setzte die Viruspartikel frei.Die grösseren Zellbruchstücke wurden als Sediment in einem folgenden Zentrifugationsschritt(10 Minuten,1000g,4°C) abgetrennt,und der virushaltige Überstand zweimal mit Trichlor-Trifluoro-Äthan(Freon 113) extrahiert,um ihn von Membranbestandteilen zu befreien.Weitere Anreicherung des Virusmaterials aus diesem Zellrohextrakt erfolgte über drei sukzessive Gleichgewichtzentrifugationsschritte in CsCl-Gradienten. Der wässerige Extrakt wurde dazu nach der Formel x ml Lösung + x/2 g CsCl auf eine Ausgangsdichte von 1,334 g/cm^3 gebracht.Nach zwei Stunden bei 47000 UpM,4°C in der Ultrazentrifuge(Rotor TV 865) findet man das Virusmaterial als deutlich sichtbare weisse Bande bei der mittleren Schwebedichte eingeordnet.Die so konzentrierten Partikel wurden nach Austropfen des Gradienten zwei weiteren derartigen Reinigungsschritten unterzogen und in der CsCl-Lösung bei 4°C aufbewahrt.
Um virale DNA radioaktiv zu markieren wurde die Nährlösung 4 bis 5 Stunden nach Infektion auf

10 ml verringert und die weitere Inkubation in Gegenwart von 10 µCi/ml ^{3}H-Thymidin durchgeführt. Eine Markierung viraler DNA mit ^{32}P erfolgte durch Zugabe ^{32}P-haltigen Orthophosphats(250µCi/ml) in phosphatfreier Hepes-gepufferter(10mM) Nährlösung 4 Stunden nach Infektion.Zuvor war das ursprüngliche, phosphathaltige Medium abgegossen und der Zellrasen mit warmer Tris-Salzlösung gewaschen worden.In beiden Fällen ist die weitere Reinigung mit der Standardprozedur beschrieben.
Um das Ergebnis einer Markierung quantitativ zu erfassen,wurde ein Aliquot der Viruslösung auf Glasfilterpapier(Whatman GF/A) getrocknet,mit 5ml Szintillationsflüssigkeit versehen,und in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer(Packard) die Zerfälle pro Minute ermittelt.

3.2.2. Virusvermehrung in Suspensionskultur

HeLa-Suspensionskulturen in Glasgefäßen wurden bei einer Zelldichte von 1x10^{6} Zellen pro ml mit 20-100 pfu/Zelle aus Virusstammlösungen infiziert.Nach einer Adsorptionszeit von etwa einer Stunde bei 37°C wurde die Zelldichte in einem entsprechenden Volumen der Nährlösung wieder auf 2-5x10^{5} Zellen pro ml verringert und die Inkubation bei 37°C für weitere 40-48 Stunden fortgesetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt(15 Minuten, 1000 g,4°C).Das resultierende Zellsediment wurde entweder in sterilem Tris-Puffer aufgenommen und nach Ultraschallbehandlung als Virusrohextrakt bei -80°C aufbewahrt oder in 0,02M Tris-Puffer zur präparativen Virusgewinnung weiterverarbeitet wie beschrieben.

3.3. Extraktion viraler DNA aus isolierten Viruspartikeln

3.3.1. Gewinnung proteinfreier DNA

Zunächst wurde eine gereinigte Virussuspension gegen ungefähr 2000 Volumen BND-A-Puffer dialysiert und vom CsCl befreit, mithilfe dessen die letzten Reinigungsschritte durchgeführt worden waren. Der Proteinanteil in den Virionen wurde aufgeschlossen und verdaut, indem das Dialysat einer zweistündigen Inkubation bei 37°C in Gegenwart von 4mM EDTA, 0,5% SDS und 200µg/ml Proteinase K ausgesetzt wurde. Die proteinfreie DNA konnte dann in zwei Folgebehandlungen mit mit Boratpuffer gesättigtem Phenol in der wässerigen Phase extrahiert werden. Ausgiebige Dialyse (3 bis 4mal 2l) gegen BND-A-Puffer oder gegen 50 mM NaCl-10mM Tris, pH8 beseitigte Phenolrückstände. Die DNA - Lösung wurde im Dialysepuffer bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2. Extraktion viraler DNA, die noch das kovalent gebundene Protein an ihren 5'Enden enthält

Die CsCl-Lösung mit gereinigter Virussuspension wurde 4M an Guanidiniumhydrochlorid gemacht, außerdem 0,01%ig an Sarkosyl -um Wechselwirkungen mit den Wänden der Zentrifugenröhrchen zu verhindern- und auf eine Dichte von 1,468g/cm^3 eingestellt (Rekosh et al., 1977). Nach 15 Stunden bei 45000 UpM, 18°C, Rotor TV865 , erscheint der DNA/Protein-Komplex eingeordnet bei einer mittleren Schwebedichte im Salzgradienten und läßt sich

durch fraktioniertes Austropfen von den übrigen Virionbestandteilen trennen.DNA-haltige Fraktionen wurden durch Radioaktivitätsmessung ermittelt wie beschrieben(3.2.1).
Für die Extraktion aus Partikeln,deren DNA unmarkiert vorlag,diente ein ausreichendes Volumen radioaktiver DNA/Protein-Komplex-Lösung,vor der Zentrifugation zugesetzt, als Dichte-Markierung. War das nicht möglich,so wurden die DNA-haltigen Fraktionen anhand der optischen Dichte bei 260 und 280nm bestimmt.Die weitere Reinigung (Dialyse) erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben, wobei besonders auf die starke Tendenz des DNA/Proteinkomplexes geachtet werden mußte,unspezifische Wechselwirkungen mit verschiedenen Oberflächenstrukturen einzugehen.

3.4. Charakterisierung viraler DNA-Synthese bei Wildtyp und Mutante anhand von Pulsexperimenten im permissiven bzw. nicht permissiven Temperaturbereich

30 mm Petrischalen,in denen HeLa-Zellen fast konfluent geworden waren(etwa 1 $x10^5$ Zellen),wurden mit ad2 Wildtyp oder der Mutante ts206 infiziert wie in 3.2.1 beschrieben,nur ausgehend von 0,1-1 pfu/Zelle in 0,3 ml Medium.Nach Ablauf einer 50 minutigen Adsorptionszeit wurde die Inkubation bei 32°C,bzw.40,5°C mit je 1,5ml frisch zugesetzter Nährlösung(2%ig an Kälberserum) weitergeführt.In einem Zeitintervall,in dem maximale virale DNA-Synthese stattfindet(Kathmann et al.,1976),erfolgte zusätzlich eine Inokulation mit ^{3}H-Thymidin(10µCi/ml).Bei den 40,5°-Platten geschah das in einem

Zeitraum von 12 bis 24 Stunden nach Infektion,bzw. mock-Infektion für jeweils eine Stunde.Bei den 32°-Platten wurde die beschriebene Markierung während zwei Stunden in einem Zeitraum von 60 bis 120 Stunden nach Infektion vorgenommen.Am Ende der Markierungsdauer wurden die Zellen bei 4°C viermal mit Tris-gepufferter Salzlösung gewaschen und in einem Milliliter der gleichen Lösung suspendiert. Das Sedimentationsverhalten markierten Materials in dieser Suspension wurde anhand von 50µl Aliquots zusammen mit ^{32}P-markierter,routinemäßig isolierter(3.2) VirusDNA in alkalischen,5 bis 20-prozentigen Rohrzuckergradienten getestet. Die Gradienten waren 0,3M an NaOH, 0,7M an NaCl und 5mM an EDTA(pH8);70-prozentige Rohrzuckerlösung am Boden der Gradienten diente als Kissen.

3.5. Sedimentationsverhalten viraler DNA aus pulsmarkierten Zellen

Je 50µl Zellsuspension aus einem Pulsmarkierungsexperiment wurden zusammen mit 25µl einer Heparinlösung(0,1% Heparin,1% Sarkosyl in TE-Puffer) und einem geeigneten Volumen ^{32}P-markierter Virus-DNA-Lösung auf die alkalischen Rohrzuckergradienten (3.4)aufgetragen und ungefähr 14 Stunden bei 14°C stehengelassen,um vollständige Zellysis zu gewährleisten.Das Sedimentationsverhalten ^{3}H-pulsmarkierten Materials wurde nach Zentrifugation(47000 UpM,90 Minuten,4°C,Rotor AH 650)anhand der fraktioniert ausgetropften Gradienten ermittelt(3Tr./Fraktion, Hölzel Fraktionssammler).Dazu wurden die Fraktionen 5%ig an Trichloressigsäure gemacht und 30 Minuten bei 4° inkubiert.Ausgefällte Nukleinsäuren wurden dann konzentriert,indem die Suspensionen mit Hilfe

einer Wasserstrahlpumpe durch GF/A Filter(Whatman) passiert wurden.Nach mehrmaligem Waschen und dem Trocknen der Filter wurde die Radioaktivität auf ihnen ermittelt wie in 3.2.1.

3.6. Infektivitätsmessung viraler Stammlösungen von Ad2 und H2 ts206 Virusisolaten. Plaquetest

HeLa-Einschichtkulturen,die in 30 mm Petrischalen fast konfluent geworden waren,wurden mit 0,01 bis 1 pfu pro Zelle von "Virusverdünnungen" in Tris-gepufferter Salzlösung(0,4 ml/Platte) 50 Minuten lang bei 37°C inkubiert.Nach Ablauf der Adsorptionszeit wurde dieses Inokulum gegen 4ml einer Nährlösung folgender Zusammensetzung ausgetauscht:Dulbecco's Medium,0,8%ig an Agarose, 5%ig an Pferdeserum und 25mM an $MgCl_2$.Die Gießtemperatur lag bei ungefähr 45°C.Die Zellen wurden noch bei Zimmertemperatur stehengelassen bis die Agarose vernetzt war,und die Inkubation dann bei 32 bzw. 39,5°C fortgesetzt.Eine zweite Überschichtung mit Agar-Nährlösung erfolgte am 5.bzw. 2. Tag nach Infektion,eine letzte,die zusätzlich 0,01% Neutralrot enthielt am 9.bzw. 4. Tag.Plaques konnten zwei bzw. einen Tag danach gezählt werden.Ausgehend von Mittelwerten dieser Auswertung wurde die Infektivität für einen Milliliter der jeweiligen Ausgangsvirusstammlösung(pfu/ml) für eine Temperatur errechnet.

3.6.1. Plaquereinigung

Einzelplaques,die im Fall von H2 ts206 bei 32°C

gewachsen waren,wurden mit einer Pasteurpipette aus dem Agar ausgestanzt,in 1 ml Dulbecco's Medium aufgenommen und die Virionen durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen freigesetzt.So erhaltene Mutante-Isolate wurden in Plaquetests bei 39,5 und 32°C auf ihre Reinheit getestet und gegebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

3.7. Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsendonuklease SalI wurde aus Streptomyces albus Stämmen nach einer generalisierten Vorschrift angereichert(Greene et al.,1978).Andere verwendete Restriktionsenzyme wurden teilweise von Mitarbeitern des Arbeitskreises Winnacker gereinigt, oder von Pharmafirmen bezogen.

3.8. Fragmentierung von AdenovirusDNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

1-200µg gereinigte,gegen TN dialysierte Ad2 DNA wurde in einem Ansatzvolumen von 50-2000µl zusammen mit 3-30µl der jeweiligen Nukleasepräparation bei 37° inkubiert.Das Verhältnis zwischen DNA-Menge, Enzymmenge und Inkubationsdauer war dabei so gewählt, daß die Fragmentierung nach längstens 6 Stunden(präparative Fragmentierung) und schnellstens einer Stunde(Fragmentierung für "blot"-Gele) vollständig war. Anschließend wurde das Ansatzvolumen eingestellt auf 10% Rohrzucker und 0,05% Bromphenolblau und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Salzbedingungen für die Fragmentierung mit

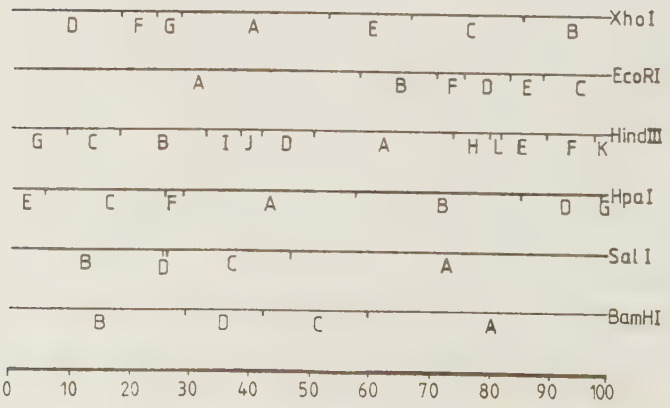
den einzelnen Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 2 aufgestellt.

Tab.2:

Restriktionsenzym	Salzbedingungen	
Eco RI	NaCl	50mM
	Tris, pH7,5	100mM
	$MgCl_2$	10mM
HindIII, HpaI	NaCl	50mM
	Tris	10mM
	$MgCl_2$	10mM
Bam HI	NaCl	100mM
	Tris	10mM
	$MgCl_2$	10mM
XhoI	NaCl	100mM
	Tris	10mM
	$MgCl_2$	10mM
	DTT	6mM
SalI	NaCl	50mM
	Tris	10mM
	$MgCl_2$	10mM
	DTT	2mM

Das Fragmentierungsmuster, zu dem die verwendeten Restriktionsenzyme Anlaß gaben ist in Abb.3 dargestelllt.

Abb.3:



3.9. Elektrophoretische Auftrennung von Ad2 Restriktionsfragmenten.

3.9.1. Elektrophoretische Trennung auf Agaroseflachgelen

Es wurden Agaroseflachgele einer Stärke von 3-7mm und unterschiedlicher Länge in Apparaturen mit vertikaler wie mit horizontaler Laufrichtung verwendet.Die Agarosekonzentration betrug dabei 0,8 bis 1% in Elektrophoresepuffer(Tris-acetat,pH8,5, 40mM,EDTA,pH8,1mM),außerdem enthielten die Gele 0,5 µg/ml Ethidiumbromid.Fragmentgemische nach 3.8 wurden je nach Grösse der Geltaschen in einem Volumen von 50-100 ul aufgetragen,die DNA in einem halbstündigen "Vorlauf" bei 20 bis 30 mA konzentriert und die Elektrophorese dann bei 60 V und Raumtemperatur für ungefähr 5 Stunden im Fall von Vertikalgelen(15 cm lang) durchgeführt.Im Fall der Horizontalgele(30 cm lang) betrug die Elektrophoresedauer 12 bis 17 Stunden bei 100mA.Die resultierenden Fragmentbanden,im langwelligen UV-Licht sichtbar, wurden photografiert und entweder auf Nitrozellulosepapier übertragen oder getrennt voneinander isoliert.

3.9.2. Elektrophoretische Trennung auf Agaroserundgelen

Gelzusammensetzung und Puffer entsprachen den Bedingungen für Flachgele.Agaroserundgele(Länge 18cm, ø 1cm) wurden ausschließlich benutzt,um Fragmente für die Marker-Rescue-Versuche zu gewinnen.In einem Probevolumen von 300µl wurden 100 bis 300µg fragmentierter DNA aufgetragen und 1/2 Stunde bei 20 bis 30 mA

konzentriert.Die Elekrophorese dauerte 18 bis 26 Stunden bei etwa 100 mA und Raumtemperatur.

3.10. Isolierung elektrophoretisch getrennter Fragmente zur Verwendung im Marker Rescue Verfahren

Die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurden so herausgeschnitten,daß nur das Kernstück entfernt wurde,eventuelle Überlappungsbereiche aber im Gel zurückblieben.Die so erhaltenen Agarosestückchen wurden einzeln und wenn möglich steril weiterbehandelt.Sie wurden mechanisch zerkleinert,in einem möglichst geringen Volumen KJ-Lösung aufgelöst,mit festem KJ auf eine Dichte von 1,5 eingestellt und einem Gleichgewichtszentrifugationslauf unterzogen. Nach 20 Stunden bei 15°C,47000 UpM (Rotor TV865) wurden die Gradienten fraktioniert ausgetropft. Um ein Auffinden der Fragmentbanden zu erleichtern war ein ausreichender Anteil viraler DNA radioaktiv markiert in dieses Verfahren eingesetzt worden,so daß fragmenthaltige Fraktionen anhand der Radioaktivitätsverteilung im Gradienten ermittelt werden konnten(Cerenkow).Fraktionen,die ein Maximum an Radioaktivität enthielten wurden gesammelt und ausgiebig gegen 0,1xSSC dialysiert.

3.10.1. Isolierung speziell aus Rundgelen. Elektrophoretisch katalysierte Bindung an Hydroxyapathit

Das Verfahren ist grundsätzlich beschrieben bei Bernardi(1971).

Fragmentbanden wurden ausgeschnitten wie aus Flachgelen,mit Hilfe von flüssiger Agarose neuen, etwas kürzeren Rundgelen bündig aufgelagert,mit Hydroxyapathit überschichtet und einer weiteren Elektrophorese,aber in umgekehrter Laufrichtung (+Pol oben) unterzogen.Nach 20 Stunden bei 50 bis 60 V befanden sich auch große Fragmente quantitativ im Hydroxyapathit.Die Elution erfolgte,indem 1 Volumen eines 0,7M Na-PO_4Puffers (pH 6,7) 30 Minuten bei 37°C mit der Hydroxyapathitfraktion inkubiert wurde.Der fragmenthaltige Überstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt(10 Minuten,1000g) und ausgiebig gegen 0,1xSSC dialysiert.
Die Fragmentausbeute aus beiden Verfahren betrug 40 bis 60 Prozent,je nach Grösse der Fragmente, bezogen auf die errechnete Ausgangsmenge.

3.11. Restriktive Transfektion von HeLa-Einschichtkulturen durch virale DNA isoliert aus Ad2 und H2 ts206 Virionen

HeLa-Einschichtkulturen fanden Verwendung wie in 3.6.Die Methode zur Transfektion ist im Wesentlichen beschrieben von Graham und van der Eb(1973).Durch Verwendung von DNA-Protein-Komplex anstelle von mit Proteinase K isolierter DNA konnte die plaquebildende Effizienz erheblich erhöht werden(Sharp et al.,1976,Ullrich,1979, Galos et al.,1979).Auch eine kurze Nachbehandlung der Zellen mit DMSO(Stow und Wilkie,1976) oder Glyzerin(Frost und Williams,1978) dient diesem Zweck(Abb. 4)
Viraler DNA-Protein-Komplex in 0,1xSSC wurde in folgendem Ansatz für die Transfektion vorbereitet.

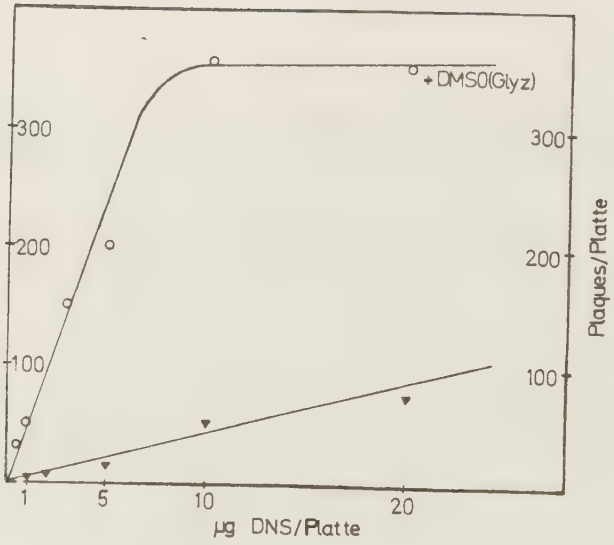


Abb. 4 :Transfektionseffizienz von Ad2 DNA-Protein-Komplex mit (—o—) und ohne (—▾—) Nachbehandlung.

In einem Volumen von 400µl pro 30mm Platte wurden x µg DNA-Protein-Komplex aus Wildtyp- oder Mutante-Virionen in Gegenwart von $CaCl_2$(130mM) und Lachssperma-"carrier"-DNA (20µg/ml) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.Die so erhaltene Suspension an Ca-PO_4-DNA Niederschlag wurde 40 Minuten mit dem mediumfreien Zellrasen ebenfalls bei Raumtemperatur inokuliert.Dann wurden 1,5 ml Dulbecco's Medium (5%ig an Pferdeserum) dazugegeben und die Inkubation für weitere 3 Stunden 15 Minuten bei 37°C fortgesetzt.

Anschließend wurde mit 4ml Dulbecco's Medium gewaschen,die Zellen für 2,5Minuten einer DMSO- oder Glyzerinlösung(25% DMSO oder 20% Glyzerin in Hepes-gepufferter Salzlösung,pH 7,2 - 0,3ml/ Platte)ausgesetzt,dann noch zweimal mit Dulbecco's Medium gewaschen.Die so infizierten Zellen wurden mit 4ml Agarose-Nährlösung überschichtet(3.6), bei 39,5°C inkubiert und weiterbehandelt wie in 3.6 beschrieben.

3.11.1. Auflösung des Transfektionsergebnisses in einem Folgeplaquetest

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit viraler DNA erfolgte wie beschrieben.Im Anschluß wurde anstelle der Agarnährlösung ein gleiches Volumen flüssigen Mediums(Dulbecco's,2%ig an Pferdeserum) verwendet,die Zellen dann nach dreitägiger Inkubation bei 39,5° gewaschen und in 1ml einer Tris-gepufferten Salzlösung suspendiert und eingefroren. Zur weiteren Untersuchung wurden sie insgesamt dreimal eingefroren und wiederaufgetaut und in den Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-3} Plaquetests bei der restriktiven Temperatur unterzogen.

3.12. Transfektion von HeLa-Einschichtkulturen durch virale Mutante-DNA zusammen mit gereinigten Wildtyp-DNA-Fragmenten unter restriktiven Bedingungen,Marker Rescue

Dazu wurde grundsätzlich verfahren wie in 3.11 , nur daß DNA-Protein-Komplex,isoliert aus H2 ts206 Virionen zusammen mit gereinigten Wildtyp-DNAfrag-

menten zum Einsatz kam.Getestet wurden Ad2 DNAfragmente aus Verdauungen mit folgenden Restriktionsendonukleasen: Bam HI,Eco RI,Hpa I, Sal I und Hind III. Für jede 30 mm Platte wurden jeweils 0,1µg Mutante-DNA (Für optimale DNA-Menge eines solchen Ansatzes siehe Tab. 4 und Abb. 4) und zweimal die entsprechende molare Menge eines der Wildtypfragmente eingesetzt.Als Kontrolle dienten Petrischalen,die mit Wt-DNA-Protein-Komplex,nur mit Lachssperma-DNA (=mockinfiziert), oder ganz ohne Nukleinsäuren nach dem beschriebenen Verfahren (3.11) transfiziert wurden.Genaue Marker-Rescue Bedingungen sind aufgelistet in Tabelle 3 .

400µl Ansatzvolumen
pro 30 mm Platte

Lachssperma-"carrier"-DNA (ultraschallbehandelt)	20 µg/ml,ausgehend von einer 200 µg/ml Lösung
HeBS (HEPES-gepufferte Salzlösung)	1 x konzentriert
genomische DNA (Protein-Komplex)	0,1 µg
Fragment-DNA	0,1 µg x %Genomanteil x 2
$CaCl_2$	130 mM,ausgehend von einer 2M Lösung

Tab. 3 : Marker-Rescue Bedingungen

3.13. RNA-Isolierung aus restriktiv infizierten HeLa-Zellen zu frühen Zeiten nach Infektion bzw. mock-Infektion

3.13.1. Infektionsbedingungen

Für alle Reinigungsschritte wurden,soweit das möglich war,sterile Lösungen und Gefäße benutzt.Von der Verwendung von RNAase-Inhibitoren wurde abgesehen,weil die Ausbeuten an RNA auch ohne eine solche Maßnahme reproduzierbar hoch waren.
RNA-Anreicherung folgte im wesentlichen den Richtlinien,die angegeben sind bei Penman,1966,Celma et al.,1977 und bei Berk und Sharp,1979.Es wurden aber auch Anregungen aus verschiedenen anderen Literaturvorlagen aufgegriffen.
Zunächst wurden HeLa-Zellen in Suspensionskultur mit Virusrohextrakten von Ad2 und H2 ts206 infiziert (3.2.2),wobei 5 bis 15 pfu pro Zelle eingesetzt wurden.Es hat sich bewährt,die HeLa-Zellen in einem entsprechenden Volumen frischen Nährmediums ohne Serum zu infizieren und für die Folgeinkubation (4,25 Stunden bei 40,5°C im Wasserbad) dann 1,5 Vo- frischen und ein gleiches Volumen "alten" Nährmediums -in dem die Zellen gewachsen waren- hinzuzufügen (R.Schilling,persönl.Mitteilung).

3.13.2. Anreicherung von RNA aus restriktiv infizierten Zellen

Nach vier Stunden,15 Minuten bei der nicht permissiven Temperatur wurden die Zellsuspensionen mit einem Volumen eiskalter Tris-Salzlösung versehen

und 10 Minuten bei 1000g abzentrifugiert.Alle weiteren Schritte wurden ,wenn nicht anders angegeben bei 4°C durchgeführt.
Vorher waren etwa 100 ml der mit Wildtypvirus infizierten Zellen abgezweigt worden,die für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert,und dann auf Viruswachstum untersucht wurden.
Das Zellsediment wurde noch zweimal gewaschen,dann in fünf Volumen eines hypotonischen detergenshaltigen Puffers (10 mM NaCl,1,5 mM $MgCl_2$,100mM Tris, pH7,4,0,6% NP40) aufgenommen und bei 4°C stehengelassen.Nach spätestens 10 Minuten waren in allen Experimenten die Kerne vollständig freigesetzt,die zusätzliche Anwendung eines Dounce-Homogenisators erwies sich als unnötig.In einem folgenden Zentrifugationsschritt(7 Minuten,1500 UpM,Christ-Tischzentrifuge) wurden die Zellkerne als Sediment von der Zytoplasmafraktion abgetrennt und dann noch zwei mal mit hypotonischem Puffer gewaschen.
Die Zytoplasmafraktion wurde einem weiteren Zentrifugationsschritt unterworfen,vorsichtig abpipettiert um etwaige Sedimentrückstände zu beseitigen und dann weiterbehandelt wie in 3.13.2.2.

3.13.2.1. RNA-Anreicherung aus den Kernen infizierter Zellen

Das Kernpellet wurde lysiert durch Zugabe einer 8M Lösung von Guanidiniumhydrochlorid(25mM Kaliumazetat) im Verhältnis 5ml/1x10^8Zellen und mit zusätzlich 0,6Volumen Äthanol über Nacht bei -20°C stehengelassen.Ausgefällte RNA aus diesem Ansatz wurde sedimentiert (30 Minuten,10000 UpM,Rotor SS34) und in ein bis zwei Millilitern des folgen-

den Puffers aufgenommen:NaCl,50mM, Tris,pH7,4, 10mM, $MgCl_2$,10mM.Anschließend wurden 100µg/ml DNAase (RNAasefrei) zugesetzt und die RNA-Lösungen bei 37°C unter häufigem,vorsichtigen Schütteln solange inkubiert,bis jeder Anschein von Viskosität verschwunden war.Eine versuchsweise Vorbehandlung mit Jodoazetat(Zimmermann und Sandeen,1966) brachte einen starken Aktivitätsverlust,aber keine Verbesserung der Ausbeuten mit sich und wurde im weiteren nicht mehr angewendet.DNAase-behandelte RNA-Lösungen wurden in drei Volumen eines Harnstoffpuffers(Harnstoff,350mM,NaCl,175mM,Tris,pH7,4, 5mM,EDTA,5mM SDS,0,5%) aufgenommen und phenolextrahiert.Die Proteinextraktion erfolgte zunächst mit einer auf 60°C erwärmten Phenollösung,dann mit einem kalten Gemisch aus Phenollösung und einem Gemisch aus $CHCl_3$/Isoamylalkohol(24/1) im Verhältnis 1:1. Der Phenolanteil lag gesättigt mit einem sauren, wässrigen Puffer vor(NaOac,pH6,10mM,NaCl,100mM, EDTA,1mM),Auf drei Extraktionen nur mit Phenol folgte eine mit dem Phenol/Chloroform-Gemisch,die resultierende wässrige Phase wurde mit 2,5 Volumen Äthanol(0,2M an NaOac) vermischt und über Nacht bei -20°C inkubiert.Ausgefällte RNA wurde bei 10000 Upm, 30 Minuten,Rotor SS34 sedimentiert und noch mindestens zweimal mit dem Äthanol/Azetat-Gemisch gewaschen, um Phenol- und Salzreste zu entfernen.Die gereinigte RNA wurde in ein bis zwei Millilitern destillierten Wassers aufgenommen,die Konzentration der Lösung wurde anhand der optischen Dichte bei 260nm bestimmt und die RNA dann portioniert in Äthanol (0,2M an NaOac) bei -20°C aufbewahrt.

3.13.2.2. RNA-Anreicherung aus dem Zytoplasma restriktiv infizierter Zellen

Der sorgfältig von Kernen befreite zytoplasmatische Überstand aus 3.13.2 wurde sofort weiterverarbeitet. In einem ersten Zentrifugationsschritt wurden zunächst die Mitochondrien abgetrennt(10000 UpM, 20 Minuten,Rotor,SS34)dann dem Überstand ein Volumen eines Harnstoffpuffers(Harnstoff,7M,NaCl,0,35M, Tris,pH7,4,0,01M,EDTA,0,01M,SDS,1%) zugefügt und eine ausgiebige Proteinextraktion durchgeführt wie schon für die Kernfraktion beschrieben.Auch die weitere Behandlung entspricht der für nukleare RNA aufgeführten(3.13.2.1.).
Unter den beschriebenen Bedingungen konnten durchschnittlich zwei bis drei mg RNA aus 1-2x10^8 Zellen isoliert werden.

3.14. In vivo ^{3}H-Markierung von RNA aus restriktiv infizierten Zellen

Infiziert wurden HeLa-Einschichtkulturen,die in 8,5 cm Petrischalen fast konfluent geworden waren (ca.7,6x10^5 Zellen).Die Infektionsbedingungen entsprachen den in 3.2.1 aufgeführten.
Nach der Adsorptionsphase wurde der Zellrasen einer Platte mit 10ml Dulbecco's Medium versehen und eine Stunde lang bei 39,8°C inkubiert.Dann wurde dieses Medium durch 3ml einer gleichen Nährlösung ersetzt, die zusätzlich 450 µCi 5,6-^{3}H-Uridin enthielt,und die Inkubation bei 39,8°C für weitere 3 Stunden und 15 Minuten fortgesetzt.Im Anschluß wurde ausgiebig mit eiskalter Tris-Salzlösung gewaschen,die Zellen mit Hilfe autoklavierter Kunststoffplättchen

in Suspension gebracht,und die RNA daraus angereichert wie beschrieben(3.13).
Durchschnittliche Ausbeuten für je eine Platte waren:

Kernfraktion	10µl/5200ul	28000 cpm
Zytoplasmafraktion	10µl/1500ul	20000 cpm

Die Spezifität der Infektion(wt,ts oder mock) bewirkte dabei keinen Unterschied in der Markierungsintensität.

3.15. Hybridisierung filterimmobilisierter Ad2 DNA gegen "früh" isolierte RNA aus restriktiv infizierten Zellen

Hybridisierungen wurden durchgeführt auf der Basis der von Green(1969) und Ortin und Dörfler(1975) beschriebenen Bedingungen.Ad2 Wildtyp- und,als Kontrolle,Lachssperma-DNA wurden denaturiert,auf runden Nitrozellulosefiltern(Schleicher&Schüll, Durchmesser 25mm,Porengrösse 0,2µm) immobilisiert und gegen ^{3}H-markierte RNA(3.14) unter denaturierenden Bedingungen hybridisiert.Alle Arbeiten wurden,wie immer im Umgang mit RNA,wenn möglich steril ausgeführt.
Für ein Filter wurden 5µg DNA ultraschallbehandelt und jede DNA-Fraktion in einem geeigneten Volumen 0,1xSSC aufgenommen,so daß dann am Ende der Denaturierung 5µg DNA auf 10 ml Lösung konzentriert waren.Zunächst wurde die DNA-Lösung unter Rühren mit 1N NaOH auf pH 12,8 eingestellt,10 Minuten stehengelassen und dann mit 1N HCl vorsichtig auf einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 zurücktitriert.
Ein Viertel des so erhaltenen Volumens wurde an

20xSSC-Lösung hinzugefügt und das Restvolumen an 4xSSC addiert,um die gewünschte Konzentration (5µg/10ml) zu erhalten.
Die Nitrozellulosefilter waren inzwischen bei Raumtemperatur mindestens eine halbe Stunde lang mit 4xSSC durchfeuchtet worden,damit später eine gleichmäßige Aufnahme der DNA gewährleistet war.
Unter Vakuum wurden folgende Lösungen durch jedes Filter passiert:
1x10 ml Waschlösung(4xSSC),
dann die 10 ml DNA-Lösung,
anschließend noch 2 bis 3 mal 10 ml Waschlösung.
Die Filter wurden dann in autoklavierten Glasszintillationsröhrchen über Nacht im Exsikkator getrocknet und so aufbewahrt.Vor Gebrauch wurden sie dann im Exsikkator unter Vakuum zwei Stunden lang einer Temperatur von 80°C ausgesetzt.
Die Hybridisierung erfolgte dann in denselben Glasszintillationsröhrchen etwa zwei Tage lang bei 45°C.Für jedes Filter wurden dabei 80000 cpm RNA in einem Milliliter der folgenden Lösung eingesetzt:
50% Formamid(gereinigt über Aktivkohle und Mischbettionenaustauscher,Tibbetts et al.,1973)
5xSSC
0,1% SDS.
Die RNA in dieser Lösung wurde durch 25minutige Inkubation bei 65°C denaturiert,zu den Filtern in die Röherchen gegeben und,wie erwähnt,zwei Tage lang bei 45°C inkubiert.Während der Hybridisierungsdauer wurde darauf geachtet,daß die Röhrchen immer gut verschlossen waren.
Im Anschluß wurde dreimal mit 2xSSC gewaschen,unspezifisch bindende RNA mit RNAase A in 5ml 2xSSC verdaut(1Std.,Raumtemperatur,20µg/ml),noch einmal ausgiebig gewaschen,die Filter getrocknet und gezählt.

3.16. Flüssigkeitshybridisierung: Hybridisierung "früher" RNA aus restriktiv infizierten Zellen gegen tritiummarkierte Ad2 Wildtyp-DNA

3.16.1. In vitro-Markierung viraler DNA mit Hilfe der E.coli DNA-PolymeraseI. Nick translation

Es wurden verschiedene Methoden getestet.Der höchste Einbau resultierte ausgehend von abgewandelten Bedingungen nach Mackey et al.,1977 und Rigby et al., 1977.Für die Reaktion wurden in einem Volumen von 100µl eingesetzt:

Ad2 DNA	3µg
^{3}HdCTP(1µCi/µl,21Ci/mmol)	3nmol
dGTP,dATP,dTTP	je 10nmol
Tris-Cl,pH7,5	1mmol
KCl	5mmol
$MgCl_2$	5mmol
DNA PolI	25-30u

Die Inkubation eines solchen Ansatzes dauerte 2,5 Stunden bei 37°C,dann wurde die Reaktion mit einem Volumen einer 0,1M EDTA-Lösung gestoppt und ein Aliquot TCA-gefällt(s.3.5) und gezählt.Der Einbau lag bei $5x10^6$ bis $1x10^7$cpm/µg DNA.Nicht reagierte Nukleotide wurden mit Molekularsiebmaterial in einem Zentrifugationsverfahren(Tuszynski et al.,1980,siehe auch3.18.3.2)abgetrennt.

3.16.2. S_1Nukleaseverdauung von nicht basengepaarten Nukleinsäuren nach der Hybridisierung

Auch für diese Reaktion wurden verschiedene Methoden

getestet,die ausgehend von der ersten Beschreibung einer S_1Nuklease-Funktion aufgestellt worden waren (Vogt,1973).Folgende Kombination hat sich in dieser Arbeit als optimal erwiesen:

400µl Ansätze enthielten

Lachssperma-DNA	20µg/ml
NaCl	50-250mM
NaOac,pH4,5	30mM
$ZnSO_4$	1mM
^3H DNA(einzel- oder doppelsträngig)	10000cpm
Glyzerin	5%(w/v)
S_1Nuklease(Böhringer)	$5x10^3$u

Die Reaktion lief bei 45°C und einer Inkubationsdauer von 30 bis 60 Minuten ab.Das Inkubationsvolumen wurde 5%ig an TCA gemacht,gefällt und gezählt wie in 3.5 beschrieben.

Im Fall von einzelsträngiger,hitzedenaturierter DNA waren nach Nukleasebehandlung noch ca 120 cpm fällbar;wurde undenaturierte Doppelstrang DNA in das Verfahren eingesetzt,so waren nach Nukleasebehandlung noch 8300,im Ansatz ohne Nuklease noch 8800 cpm säurefällbar.

Unter den gefundenen Bedingungen wurden also 98% der Einzelstrang-DNA verdaut und blieben 90% der Doppelstrang-DNA erhalten.Bei Anwendung von Vorschriften aus der Literatur war der Anteil verdauter Doppelstrang-DNA oft wesentlich grösser und/oder der Einzelstrangabbau geringer.

3.16.3. Flüssigkeitshybridisierung

Hybridisierungen wurden durchgeführt ausgehend von den Bedingungen wie sie bei Berk und Sharp(1979) beschrieben sind.
"Frühe" nukleare(100µg) und zytoplasmatische RNA aus restriktiv mutante-(wildtyp-,mock-)infizierten Zellen wurden zusammen mit je 1-10x10^5 cpm ^{3}H-markierter (3.16.1) Ad2 DNA äthanolgefällt.Außerdem dienten 100µg LachsspermaDNA in einem gleichen Ansatz als Kontrolle.Der Alkoholniederschlag aus radioaktiver DNA und je einer spezifischen RNA-Sorte im Überschuß wurde mit Äthanol gewaschen,kurz lyophilisiert und dann denaturiert.Dazu wurde das Lyophilisat in 40µl Formamid(gereinigt nach Tibbetts et al.,1973) suspendiert und 30 Minuten bei 37°C gehalten,dabei gelegentlich geschüttelt.Um die Hybridisierungsreaktion zu ermöglichen wurden 10µl einer 5fach konzentrierten Salzlösung zugefügt ,so daß sich folgende Endkonzentrationen im resultierenden 50µl Ansatz ergaben:

Formamid	80%
NaCl	0,4M
PIPES,pH6,4	0,04M
EDTA,pH7,2	0,0001M

Inkubationstemperatur war 60°C(genau),die Inkubationsdauer betrug drei Stunden.Während dieser Zeit, in der die Hybridisierung ihren Maximalwert erreicht (Berk und Sharp,1979),wurden 5µl Aliquots zu bestimmten Zeitpunkten entnommen.Diese Proben wurden vermischt mit je 9Volumenanteilen eines auf 4°C gekühlten 10Volumenpuffers,der die Salzkonzentration

für eine nachfolgende S_1Nukleasebehandlung lieferte.

10 Volumenpuffer:

NaCl	0,25M
NaOac,pH4,5	0,033M
$ZnSO_4$	0,0011M
Glyzerin	5,6%(w/v)

Die hybridisierten Nukleinsäuren wurden unter diesen Bedingungen entweder bei -20°C aufbewahrt oder gleich einer S_1Nuklease Verdauung unterzogen.Dazu wurden $5x10^3$u Enzym dazugegeben und die Reaktion weitergeführt wie angegeben(3.16.2).Es zeigte sich kein Unterschied im Ergebnis,der auf den Zeitpunkt der Weiterverarbeitung hätte zurückgeführt werden können.Die Zugabe von "carrier"-Nukleinsäuren erwies sich als unnötig,wohl da eine ausreichende Menge unspezifischer Nukleinsäuren in den verwendeten RNA-Isolationen vorlag(3.13).

3.17. Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter, auf Nitrozellulosepapier übertragener RNA gegen ^{32}P-markierte Ad2 DNA. Northern-blot-Hybridisierung

3.17.1. Elektrophoretische RNA-Auftrennung

RNA, isoliert wie in 3.13. beschrieben, war portionsweise (30µg pro RNA-Sorte und Gelkanal) äthanolgefällt worden. Der Niederschlag wurde jeweils noch zweimal mit reinem Äthanol gewaschen, vorsichtig lyophilisiert und denaturiert.

3.17.1.1. Formaldehydgele

Formamid und Formaldehyd wurden entionisiert über Mischbettionenaustauscher (Tibbetts et al., 1973). Der trockene RNA-Niederschlag wurde in 40µl Denaturierungspuffer (Formamid, 50%, 1xGelpuffer, Formaldehyd, 2,2M, Bromphenolblau, 0,02%) vorsichtig suspendiert und 30 Minuten bei 60°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde durchgeführt mit Hilfe horizontaler Flachgelapparaturen in 1%igen denaturierenden Agarosegelen von ca 5mm Stärke. Die Agarose wurde in Gelpuffer (Morpholino-Propan-Sulfonsäure, 20mM, NaOac, 5mM, EDTA, 1mM). aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und mit Formaldehyd versetzt zu einer Endkonzentration von 2,2M (+ca 1/6 Volumen). Die denaturierten RNA-Proben wurden aufgetragen und nach einem "Sammellauf" (1/2Std., 15mA) für 6-8 Stunden bei 120V (60mA) elektrophoretisiert. Die Gele wurden über die doppelte Laufstrecke der Bromphenolblaubande herausgeschnitten und die RNA auf Nitrozellulosepapier übertragen.

3.17.1.2. Glyoxalgele

Verfahren wurde nach einer Methode von McMasters und Carmichael(1977).Glyoxal wurde gereinigt über Mischbe+tionenaustauschermaterial und Aktivkohle, und bei -20°C aufbewahrt.
Der trockene RNA-Niederschlag(siehe 3.17.1.1.) wurde in einem Volumen von 32µl folgender Zusammensetzung vorsichtig suspendiert:

Glyoxal,6M	5,4µl
DMSO	1,6µl
NaH_2PO_4,pH7	3,2µl
H_2O	7,4µl

Die Denaturierung erfolgte während 60 Minuten bei 50°C.Um die Proben auf Elektrophoresebedingungen einzustellen wurden vor dem Auftragen je 8µl des folgenden Puffers hinzugefügt:

Glyzerin	50%
NaH_2PO_4,pH7	0,01M
Bromphenolblau	0,4%

Elektrophorese erfolgte auf horizontalen Flachgelapparaturen in 1%igen Agarosegelen von ca 5mm Schichtdicke.Als Gel-und Elektrophoresepuffer diente 0,01M NaH_2PO_4,pH7.Der eigentlichen Elektrophorese vorgeschaltet war wieder ein "Sammellauf" bei 20V, dann wurde die Spannung für 8 Stunden auf 120V erhöht.Während dieser Zeit wurde mit Hilfe zweier Pumpen ständig der Puffer zwischen Anode und Kathode ausgetauscht,um keinen pHGradienten entstehen zu lassen.Der pH Wert im Gel unterlag dabei ständiger Kontrolle,weil schon bei pH Werten um 8 das Glyoxal

von der RNA abdissoziiert.Die Gele wurden weiterbehandelt wie in 3.17.1.1.

3.17.2. Northern blot

RNA-Gele wurden vor dem Transfer nicht vorbehandelt (Thomas,1980).Der RNA Transfer aus den Gelen auf Nitrozellulosepapier und die anschließende Hybridisierung erfolgten im wesentlichen nach Southern (1975).Nitrozellulosepapier(Schleicher&Schüll BA85, Porengrösse 0,45µm) wurde auf Gelgrösse zurechtgeschnitten,mit 10xSSC durchfeuchtet,und den Gelen luftblasenfrei aufgelegt.Nach oben und unten erfolgte eine Abgrenzung mit je zwei Lagen 3MM Papiers (Whatman);dann wurde das Gel in dieser Anordnung in einen Diffusionsstrom eingeschaltet,der zwischen einem Volumen 10xSSC-Lösung unterhalb und einem Stapel besonders saugfähigen Papiers oberhalb dieser Gel/Nitrozellulosepapier-"Sandwiches" bestand.Eine Plexiglasplatte auf der Schale mit 10xSSC trug dabei das Gel.3MM Papier,durch parallel angeordnete Spalten in dieser Platte gelegt,stellte die Verbindung zwischen Flüssigkeitsvolumen und dem aufgelagerten Stapel her.Nach 24 Stunden wurde die RNA auf der Oberfläche des Nitrozellulosepapiers während zwei Stunden bei 80°C fixiert.Zuvor waren RNA-Seite und Einlaufspuren der Gelkanäle mit Bleistift markiert worden. Die Filter wurden trocken bei 4°C und nicht länger als zwei Wochen aufbewahrt.

3.17.3. Hybridisierung

Um die Gefahr unspezifischer Bindung von DNA an die Filter zu verringern, wurden diese, vorgeschaltet der eigentlichen Hybridisierung, gegen denaturierte Kalbsthymus-DNA in hoher Konzentration praehybridisiert. Das Volumen dazu wurde so bemessen, daß für 1cm^2 Nitrozellulosepapier 50 bis 100µl Hybridisierungslösung eingesetzt waren.
Zusammensetzung:

Denhardt's Lösung	5x
Kalbsthymus-DNA (denaturiert und geschert)	150µg/ml
SSPE	5x
Formamid (entionisiert)	50%

1xDenhardt's	0,02% Rinderserumalbumin 0,02% Ficoll 0,02% Polyvinylpyrrolidon
1xSSPE	0,18M NaCl 0,01M $NaPO_4$, pH7,4 0,001M EDTA

Die Praehybridisierung wie die Hybridisierung erfolgte in Polyaethylenbeuteln bei 42°C in einem Schüttelwasserbad. Nach 4 bis 24 Stunden wurde die Praehybridisierungslösung gegen ein gleiches Volumen Hybridisierungslösung ausgetauscht. Deren Zusammensetzung unterschied sich in folgenden Parametern:

1xDenhardt's	anstelle von 5x
100µg/ml denaturierter Kalbsthymus-DNA	anstelle von 150µg/ml

Zusatz von Dextransulfat (10%,w/v)

Zusatz von denaturierter, ^{32}P-markierter Ad2 DNA($1x10^8$cpm, 1µg)

Die Konzentration an SSPE und Formamid blieb gleich. Hybridisierungsdauer war 24 Stunden, die Inkubationsbedingungen entsprachen den für die Praehybridisierung angegebenen. In jedem Ansatz wurden höchstens zwei Filter hybridisiert, deren RNA-Seiten dann voneinander abgewendet waren. Hybridisierungslösungen wurden nach Gebrauch bei -20°C gelagert, bis zu fünf mal benutzt, und vor jedem neuen Einsatz hitzedenaturiert (7 Minuten, 100°C). Außerdem wurden sie jedesmal neu mit Denhardt's Lösung versehen.

Die Filter wurden nach der Hybridisierung zunächst mit 2xSSPE, 0,1%ig an SDS (3x1 Hybridisierungsvolumen bei Raumtemperatur) gewaschen und dann in einem großen Volumen 0,1xSSPE, 0,1%ig an SDS im Wasserbad bei 50°C solange geschüttelt, bis die Radioaktivität auf den Filtern pro Waschvorgang kaum noch abnahm.

Die Filter wurden dann mit Hilfe von 3MM Papier getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen.

3.18. Hybridisierung elektrophoretisch aufgetrennter, auf Nitrozellulosepapier übertragener Ad2 DNA-Fragmente gegen ^{32}P-markierte RNA-Proben. Southern-blot-Hybridisierung

RNA aus infizierten Zellen wie in 3.17 wurde in 5µg Aliquots äthanolgefällt, mit Polynukleotidkinase ^{32}P-markiert, und unter denaturierenden Bedingungen gegen fragmentierte, immobilisierte Ad2 DNA hybridisiert. DNA-Fragmente lagen als Spiegelbild ihres Elektrophoresemusters fixiert auf Nitrozellulosefiltern (Schleicher und Schüll, BA 85) vor. So konnte nach der Hybridisierung gebundene RNA als Schwarzfärbung an der Stelle spezifischer Fragmentbanden autoradiographisch sichtbar gemacht, und anhand von Photografien der Ausgangsgele und der bekannten Genkarten einem definierten Bereich auf dem viralen Genom zugeordnet werden.

3.18.1. DNA-Fragmentierung und elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in Agarosegelen

Die Methode dazu ist im wesentlichen in 3.8. bzw 3.9. beschrieben.
Es hat sich aber bewährt für die Hybridisierung gegen markierte RNA mit geringem Homologieanteil nicht wie üblich Nanogrammengen, sondern gerade so viel fragmentierte DNA aufzutragen, wie noch gut getrennt werden kann. Das entsprach für die angegebenen Bedingungen einer DNA-Menge von 1µg/Gelkammer bei Verwendung kleiner Gelkammern (Start-

fläche 75x4mm²)und 3µg/Gelkammer bei großen Gelkammern(Startfläche 150x4mm²).
Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1%igen Agarosegelen auf horizontalen Flachgelapparaturen wie beschrieben.Gele mit den aufgetrennten Fragmenten konnten bis zu 3 Tage lang bei 4°C (vor dem Austrocknen geschützt)gelagert werden,bevor sie der blot-DNA-Übertragung unterzogen wurden,ohne daß im Ergebnis Diffusionserscheinungen sichtbar wurden.

3.18.2. Übertragung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente auf Nitrozellulösefilterpapier

Die Methode von Southern(1975) wurde in abgewandelter Form angewendet.

3.18.2.1. Denaturierung der DNA-Fragmente im Gel vor der Übertragung

Fragmentgele wurden 2 bis 4 Stunden in einer alkalischen Denaturierungslösung(0,5N NaOH,1,5N NaCl) gebadet und dann nach Zugabe eines gleichen Volumens der entsprechend sauren Lösung(0,5N HCl,1,5M NaCl, 0,1M Tris,pH7,4) zwei Stunden lang neutralisiert. Es mußte dabei darauf geachtet werden,daß die Lösung zu Beginn der Neutralisation noch sauer war, damit sich nach Aequilibrierung mit OH^- Ionen aus dem Gel ein neutrales pH einstellte.Die Pufferkapazität des Tris-Anteils war schon bei kleinen Abweichungen von der Säure/Base Aequinormalität überfordert.Sind die"neutralisierten"Gele z.B.

noch alkalisch,so führt das,zumindest im Trockenblotverfahren ,zu alkalischen Nitrozellulosefiltern, die in der formamidhaltigen Hybridisierungslösung dann gelb werden und zerfallen.

3.18.2.2. DNA-Transfer

Das Verfahren entsprach dem für RNA aus denaturierenden Gelen beschriebenen,nur wurde als Diffusionslösung 20xSSC verwendet.
Daneben wurde DNA auch im Trockenblotverfahren ohne zusätzliche Diffusionslösung übertragen.Die Flüssigkeit,die auf diese Weise aus dem Gel durch das Nitrozellulosepapier diffundiert,nimmt etwa 2/3 der DNA mit.

3.18.3. ^{32}P-Endmarkierung isolierter RNA mit Polynukleotidkinase

Die Reaktion wurde ausgehend von verschiedenen Vorschriften durchgeführt(Maxam und Gilbert,1977, Spradling et al.,1980,Derman et al.,1981). Höchste Einbauraten wurden mit einem wie folgt kombinierten Verfahren erzielt.

3.18.3.1. Denaturierung der RNA. Schaffung freier 5'OH-Enden

RNA, in 5µg Aliquots aethanolgefällt,wurde mehrmals gewaschen,im Lyophilisator getrocknet und in je 50µl alkalischen Puffers(Tris,pH9,5,Glycin,5mM,Spermidin, 50µM,EDTA,10µM) suspendiert.Die Denaturierung zu Einzelstrangstücken von etwa 400 Basen Länge erfolgte dann während einer 30minutigen Inkubation bei 90°C.

Alkaligespaltene RNA hat 5'OH-Enden und kann direkt in die Polynukleotidkinasereaktion eingesetzt werden.

3.18.3.2. Polynukleotidkinase Markierung

Der Denaturierungsansatz wurde auf ein Volumen von 50µl erweitert und dabei 10mM an $MgCl_2$ und 2mM an DTT gemacht, außerdem wurden 20u Polynukleotidkinase(Böhringer, in 4,4µl)zugefügt. Dieses Gemisch wurde in Eppendorfröhrchen transferiert, in denen zuvor 125µCi (γ-^{32}P)-ATP eingeengt worden war, und eine halbe Stunde bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde beendet durch Zugabe von 50µl Ammoniumazetat(4M) und 200µl einer tRNA-Lösung, die 1mg/ml konzentriert war. Nicht reagierte Nukleotide und Protein wurden mit G50-Molekularsiebmaterial abgetrennt(Tuszynski et al., 1980). Dazu wurden kleine G50-Säulen in blauen Eppendorfspitzen mit 0,1xSSC aequilibriert. Sie wurden dann in sterilen Plastikzentrifugenröhrchen zwei Minuten lang bei 1000g trockenzentrifugiert; dann wurde das Reaktionsgemisch aufgetragen(300µl), der Zentrifugationsschritt wiederholt und die resultierenden 300µl Säulendurchlauf im selben Röhrchen bei -20°C aufbewahrt. An Aliquots konnte sehr gut reproduzierbar ermittelt werden, daß die Hälfte aller Zerfälle im Säulendurchlauf auf säurefällbares Material zurückführbar ist. Das entspricht einem ausreichenden Reinheitsgrad für die anschließende Hybridisierungsreaktion. Die Markierungsausbeute betrug $5x10^7$ bis $1x10^8$cpm/µg RNA.

3.18.4. Hybridisierung

Da RNA nicht unspezifisch an Nitrozellulosepapier bindet, war eine Praehybridisierung unnötig. Die DNA-Filter wurden lediglich kurz mit Hybridisierungslösung aequilibriert.
Die Hybridisierungslösung war 50%ig an Formamid (gereinigt nach Tibbetts et al., 1973) und enthielt 4xSSPE ohne weitere Zusätze. Hybridisiert wurde unter Schütteln bei 45°C für ungefähr 20 Stunden. Mit Ausnahme der angeführten Abweichungen entsprach die Methode in allen Details der in 3.17.3 für RNA-Filter beschriebenen.

4. Ergebnisse

Im folgenden ist die Charakterisierung einer temperatursensitiven Mutante von Adenovirus Typ2, H2 ts206, beschrieben,die von Kathmann et al.(1976) nach chemischer Mutagenese isoliert werden konnte.Es handelt sich um eine Mutation, die,unter restriktiven Bedingungen,schon sehr früh im viralen Infektionszyklus wirksam wird. Zu einem Zeitpunkt,an dem der virale Anteil an den biochemischen Funktionen der Wirtszelle noch verschwindend gering ist und bei einer Temperatur, die der Wirtszelle gerade noch das Überleben ermöglicht.
Um phäno- und genotypische Charakteristika,die einer solchen Mutation zugeordnet sind,untersuchen zu können,mußten Nachweismethoden mit einem ausreichend hohen Auflösungsvermögen unter den besonderen Bedingungen im restriktiven Temperaturbereich getestet werden.

4.1. Viruswachstum der Mutante im Vergleich zu Wildtypwachstum bei permissiver und nicht permissiver Temperatur in HeLa-Einschicht- oder Suspensionskulturen

4.1.1. Die plaquebildende Effizienz der Infektion. Koeffizient aus den Werten bei permissiver und restriktiver Temperatur(K_T)

Plaquetsts,wie in 3.6 beschrieben,erlauben eine Aussage über die Infektiosität einer untersuchten Virusstammlösung.Der Koeffizient der Infektiositätswerte(pfu/ml),die bei einer potentiell restriktiven und einer potentiell permissiven Temperatur erhalten werden,also z.B. $\frac{\text{pfu/ml bei } 39^{\circ}C}{\text{pfu/ml bei } 32^{\circ}C}$,ist ein Maß für die Temperatursensitivität der Virusstammlösung.Wildtypstämme haben einen K_T von eins. Kathmann et al.(1976) haben Isolate aus ihrer chemischen Mutagenisierung von Ad2 als Mutanten bezeichnet,wenn sie einen Koeffizienten von 10^{-4} oder niedriger hatten.Höhere Koeffizienten zeitigen einen zu starken Wildtypcharakter (leakyness der Mutation), um sinnvolle Untersuchungen zu erlauben.

Aus der Reihe der genannten Isolate war H2 ts206 einer von drei aus 14 Mutantenstämmen,die die untere Grenze der Klassifikation vertraten und einen Temperaturkoeffizienten(39/32) nicht kleiner als 10^{-4} aufwiesen.Der hohe Grad an "leakyness",der dadurch beschrieben ist,machte es notwendig,die Charakterisierung der Mutante anhand besonders reiner Mutantenstämme(s.3.6.1) und unter maximal restriktiven Bedingungen vorzunehmen.

4.1.2. Der nicht permissive Bereich:
optimale Bedingungen für die Restriktion von H2 ts206 in infizierten Einschicht- und Suspensionskulturen

A) Temperatur

In vielen Plaquetests mit der Mutante hatte sich gezeigt,daß deren Restriktion mit zunehmender Temperatur deutlicher wird.
Bei einer Temperatur von genau 39°C sind im günstigsten Fall K_T-Werte von 10^{-3} zu erzielen.39°C war also die untere Temperaturgrenze für Plaquetestversuche mit ts206.Die entsprechende Obergrenze war durch die Überlebensfähigkeit der Wirtszellen gesetzt.Ein Wildtypkoeffizient kleiner als eins trat zuerst bei 39,5°C auf.Der zehnte Teil der Zellen die bei 32°C noch infizierbar waren,hatte diese Eigenschaft bei 39,5°C verloren.Bei noch höheren Temperaturen waren unter Plaquetestbedingungen selbst uninfizierte Zellen nur noch zu einem geringen Teil anfärbbar,also stoffwechselaktiv.
Versuche temperaturresistente Wirtszellen zu selektionieren,indem 3 bis 4 Generationen HeLa-Zellen schon vor dem Plaquetest bei 39 anstelle von 37°C inkubiert wurden,zeigten kein positives Ergebnis. Solche Zellen erwiesen sich eher als noch anfälliger für die Schwierigkeiten eines nicht permissiven Plaquetests.Ein Maximum an Restriktion unter Bedingungen die noch eine Auswertung erlauben,wurde mit "normal" gezüchteten HeLa-Zellen bei einer Infektionstemperatur von 39,5° im Plaquetest erzielt.

Einschichtkulturen in flüssigem Medium,wie sie zur Mutantenvermehrung(3.2.1) und zu einer Variation im Transfektionsverfahren(3.11.1) verwendet wurden, waren noch bei einer Temperatur von 39,8°C gut infizierbar.
Für die RNA-Isolierung wurden HeLa-Zellen in Suspensionskultur bei einer Temperatur von 40,5°C infiziert(3.13),der höchsten Temperatur bei der unter den gegebenen Umständen deutlich Viruswachstum zu verzeichnen ist.Im Gegensatz zum Plaquetest kam es dabei hauptsächlich auf eine starke Restriktion und nicht so sehr auf ein Überleben der Zellen an,da für präparative Zwecke auch von grösseren Ansätzen ausgegangen werden konnte.

B) Luftfeuchtigkeit
(nur wichtig bei Plaquetests)

Als weiterer limitierender Faktor für Plaquetests bei der hohen,nicht permissiven Temperatur erwies sich die Tatsache,daß das überschichtete Agar-Nährmedium und damit der Wirtszellrasen sehr leicht austrocknen.
So wurden Inkubationsschränke,deren Boden als Wasserwanne konstruiert war,den besonderen Anforderungen wesentlich besser gerecht als solche, bei denen das CO_2-Luft-Gemisch durch kleine seitliche Wasserbehälter einströmt.In jedem Fall erwies es sich als vorteilhaft,den Zellrasen während der Inkubation unter restriktiven Bedingungen noch einmal mit frischem Nähragar zu versorgen,möglichst schon am ersten Tag nach Infektion,weil da der Flüssigkeitsverlust am größten war.

C) Zellalter

Viruswachstum, z.B. im Plaquetest bei der hohen Temperatur konnte auch dann nicht mehr beobachtet werden, wenn die HeLa-Zellen mehr als 52 mal passiert worden waren. Parallelansätze bei 37°C mit solchen Zellen waren stets noch auswertbar.

D) Zelldichte

In 37°C-Ansätzen werden Einschichtkulturen infiziert, die gerade Zellkontakt haben. Es hat sich gezeigt, daß Zellen im entsprechenden Wachstumsstadium eine geringere Überlebenfähigkeit unter den Anforderungen einer Infektion bei der hohen Temperatur haben als solche die schon deutlichen Zellkontakt haben. Das war insbesondere für die Marker Rescue Versuche unter restriktiven Bedingungen wichtig.

E) Multiplizität der Infektion

Ein K_T-Wert von 10^{-4} für eine temperatursensitive Mutante läßt erwarten, daß der Mutantencharakter bei einer Multiplizität der Infektion grösser/gleich 10^4 pfu pro Zelle überdeckt wird. In jeder Zelle sollte dabei, statistisch gesehen, mindestens ein Partikel den Wildtypcharakter phänotypisch ausprägen können.
Diese Erwartung hat sich im Experiment bestätigt. Schon bei einer Infektion mit 50 bis 100 pfu pro Zelle, wie es bei Wildtyppräparationen üblich ist, waren K_T-Werte der Mutante auch in kleinen Ansätzen höher als 10^{-3}. Im weiteren wurde mit möglichst niedrigen Multiplizitäten der Infektion in möglichst kleinen Ansätzen gearbeitet (siehe auch 4.2.2.)

4.1.3. Virale DNA-Synthese bei H2 ts206

Vergleichende DNA-Pulsmarkierungen nach Infektion mit Ad2 Wildtyp und der Mutante ts206 wurden bei 39,8°C und 32°C durchgeführt wie beschrieben(3.4) Bei der Mutante erschien der radioaktive Einbau in DNA viraler Länge sehr stark reduziert im restriktiven Temperaturbereich,während er bei der permissiven Temperatur ähnlich wie beim Wildtyp verläuft(Abb. 5).In diesen Versuchen konnte ein Ausdruck der "leakyness" der Mutation vermieden werden,indem mit sehr geringen Multiplizitäten in kleinen Ansätzen gearbeitet wurde.
Der temperatursensitive Schritt im Infektionszyklus der Mutante liegt also nicht nur zeitlich vor dem Beginn der DNA-Replikation ,sondern liefert in seiner Entsprechung beim Wildtyp auch eine der Voraussetzungen dafür.

4.2. Kartierung des Mutationsortes von H2 ts206

4.2.1. Restriktive Transfektion von HeLa-Einschichtkulturen mit viraler DNA, isoliert aus Wildtyp und Mutante.

4.2.1.1. Transfektionsverfahren

DNA wurde,nach Graham und van der Eb(1973), als $Ca\text{-}PO_4$-Niederschlag zur Transfektion eingesetzt. Eine Verbesserung der Infektivität viraler DNA konnte erzielt werden, wenn die DNA dabei noch

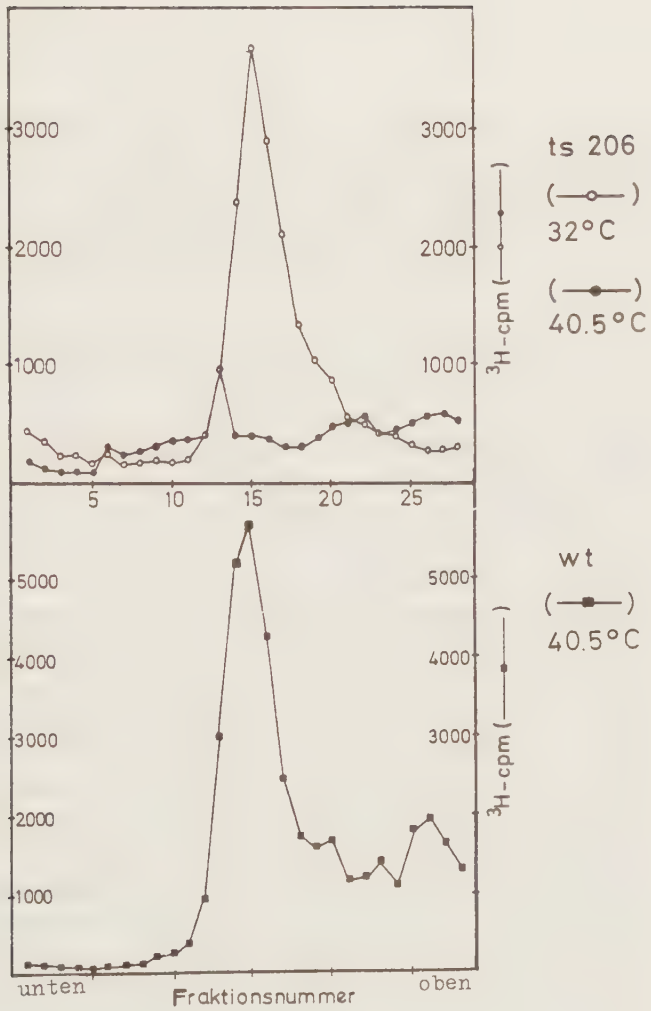


Abb.5: Virale DNA-Synthese nach permissiver (—o—) und nicht permissiver (—●—) Infektion mit H2ts206 unter den angegebenen Bedingungen(3.4). Dargestellt ist das Sedimentationsverhalten markierten Materials in 5-20%igen Rohrzucker-gradienten.Zum Vergleich ist der Parallelansatz einer Ad2-Infektion bei nicht permissiver Temperatur (—■—) abgebildet.

ihre terminalen Proteine enthielt(Sharp et al.,1976). Eine weitere deutliche Verbesserung viraler Infektiosität konnte nach dem Einsatz von DMSO(Stow und Wilkie,1976) oder Glyzerin(Frost und Williams,1978) im Transfektionsverfahren beobachtet werden(3.11 , siehe auch Abb. 4).

Transfizierte Zellen wurden entweder,wie auch im Fall der Plaquetests nach Infektion,mit Nähragar überschichtet,bei der restriktiven Temperatur weiterinkubiert und dann direkt ausgewertet.In Parallelansätzen wurde der transfizierte Zellrasen zunächst mit Flüssigmedium weiterinkubiert,dann als Virusstock eingefroren und schließlich das Resultat in Folgeplaquetests ermittelt(Galos et al.,1979).
Diese letzte Maßnahme verbesserte nicht nur Auflösung und Genauigkeit des Marker-Rescue-Verfahrens, sondern erhöhte auch die Überlebenschancen transfizierter Zellen bei der hohen Temperatur.Eine Behandlung mit 130mM Salz- und mind. 20%igen Glyzerin- bzw. DMSO-Lösungen,wie sie für den Transfektionsvorgang notwendig ist,bedeutet eine harte Belastungsprobe für die Überlebensfähigkeit der Zellen.So waren transfizierte Zellen nach einer Folgeinkubation bei 39,5^{o} viel häufiger nicht mehr anfärbbar als Zellen,die einem einfachen Plaquetest unterzogen worden waren.Wurde die Folgeinkubation bei 37^{o} durchgeführt,trat dieser Effekt nicht auf. Überschichtet man den transfizierten Zellrasen aber zuerst mit flüssigem Nährmedium und verschiebt den auswertbaren Agar-Plaquetest auf einen Folgeschritt,so werden die Belastungen der Transfektion und des Plaquetests entkoppelt.Außerdem wird

eine bessere Auflösung erreicht,weil auf diesem Wege jedes Viruspartikel aus dem transfizierten Zellrasen als Plaque erfasst werden kann. 0,1µg transfizierte Ad2 DNA gab dabei Anlaß zu durchschnittlich $2x10^4$ Plaques.

4.2.1.2. Sinnvolle DNA-Menge für Marker-Rescue-Transfektionsversuche mit H2 ts206

Die Transfektionseffizienz viraler Wildtyp-DNA mit und ohne Protein an den Enden zu untersuchen war unter anderem Gegenstand meiner Diplomarbeit (s.Abb. 4).Eine DNA-Menge von 7µg gibt demnach im direkten Verfahren schon Anlaß zu etwa 400 Plaques,einer Zahl,die sich unter diesen Bedingungen auch durch grössere DNA-Mengen nicht mehr steigern läßt.Dieser Wert entspricht etwa 10^7pfu auf der Platte,aufgeschlüsselt in Folgeplaquetests(3.11.1.). Wegen der hohen "leakyness" von H2 ts206 schien es nicht ratsam soviel DNA für Versuche mit der Mutante einzusetzen.Marker-Rescue-Effekte mit frühen Mutanten,wo die "erfolgreiche" Rekombination unabhängig vom viralen Replikations(Rekombinations)-system ablaufen muß,sind nicht sehr ergiebig(siehe Galos et al.,1979,Ullrich,1979).Um eine gute Auflösung dieser Effekte möglich zu machen,sollte daher die "leakyness" der Mutante möglichst wenig zum tragen kommen.Eine Marker-Rescue-Transfektion sollte also mit so wenig Mutante-DNA auskommen, daß gerade ein gut sichtbares Ergebnis zustandekommen kann.Transfektionsergebnisse,ausgehend von sehr geringen Mengen viraler DNA sind aufgelistet in Tabelle 4.

Tab. 4:
Infektiosität von Wt DNA(Einsatz von DNA-Protein-Komplex mit DMSO- bzw. Glyzerin-Nachbehandlung) im Bereich von 1 bis 1000ng.Die Werte wurden im direkten Transfektionsverfahren ermittelt(3.11)

ng DNA /Platte	1	5	10	50	100	1000
plaques /Platte	0	2	2	5	35	50

100ng waren unter den angegebenen Bedingungen demnach die geringste Menge viraler DNA,die noch zu einer eindeutig auswertbaren Zahl an Plaques Anlaß gibt.Auch im erweiterten Verfahren(Folgeplaque-test,3.11.1)bestätigte sich diese Menge als optimal,weil sie bei permissiver Infektion ,zu ungefähr $1x10^4$ infektiösen Partikeln(pfu/Platte) führte,während bei restriktiver Infektion noch keine Mutantenplaques auftraten.
Ein potentieller Marker-Rescue-Erfolg würde bei dieser DNA-Menge also direkt an der Zahl der plaques im nicht permissiven Bereich und wohl in ausreichendem Maße abzulesen sein.Für alle weiteren Marker-Rescue-Versuche wurden 0,1µg Mutante-DNA eingesetzt.

4.2.2. "Erfolgreiche" Fragmente aus Marker-Rescue-Versuchen mit H2 ts206 DNA

Fragmente die, zusammen mit Mutante-DNA transfiziert, Viruswachstum bei restriktiver Temperatur provozierten, sind:
Ausgehend von Verdauung der Wildtyp-DNA mit EcoRI das A-Fragment, mit HpaI das A-Fragment, mit SalI das C-Fragment, mit BamHI das D-Fragment und mit HindIII das B-Fragment.
Auch andere Fragmente als die genannten gaben manchmal Anlaß zu Plaquebildung bei der hohen Temperatur, aber in weit geringerem Ausmaß und nicht reproduzierbar. Dieses Phänomen trat hauptsächlich mit Fragmenten auf, die bei der elektrophoretischen Auftrennung etwas langsamer laufen als die "erfolgreichen" und ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Fragmentpräparationen nicht immer stöchiometrisch rein aus der Anreicherung hervorgingen.
Plaques nur ausgehend von Mutante-DNA waren unter den angegebenen Bedingungen(3.12) nicht zu beobachten, es sei denn sie traten auch auf mock-infizierten, nur mit Kalbsthymus-DNA behandelten Platten auf.
Marker-Rescueplaques waren gewöhnlich etwas kleiner als Wildtypplaques, aber gelegentlich kam es zur Bildung von "Riesenplaques", die 3 bis 4mal so groß waren wie die Wildtypinduzierten.
Das Aufreten solcher überdimensional grosser Plaques nach Adenovirus-Infektion ist auch in anderem Zusammenhang schon beobachtet worden(Chinnadurai et al., 1979).

Der Bereich, der allen "erfolgreichen" Fragmenten gemeinsam ist, lokalisiert den Mutationsort auf 2,4% des viralen Genoms zwischen der BamHI D-Schnittstelle bei Position 29,3 und der HindIII B-Schnittstelle bei Position 31,7(Abb. 6).

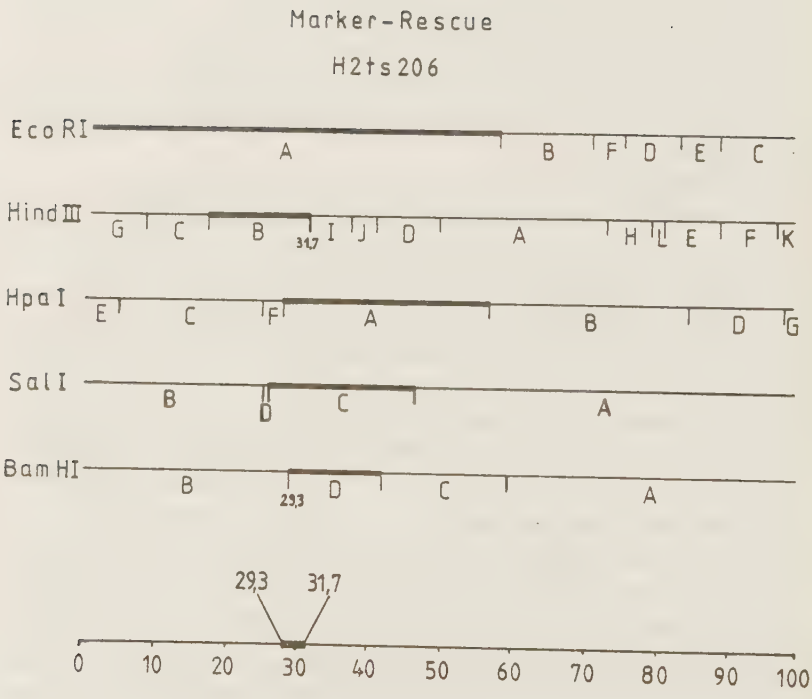


Abb.6: Kartierung des H2 ts206-Mutationsortes (4.2.2). "Erfolgreiche" Fragmente sind durch verstärkte Linien gekennzeichnet.Der gemeinsame Bereich aller dieser Fragmente ist auf der dezimalen Einteilung des Adenovirusgenoms hervorgehoben.

Die Ergebnisse aus direkt und indirekt ausgewerteten Versuchen (3.1.2.) zur Eingrenzung des möglichen Mutationsortes von H2 ts206 mit Hilfe der Marker-Rescue-Technik sind in Tabelle 5 dargestellt.
Pfu/Platte bedeutet die errechnete Anzahl infektiöser Partikel aus einer bestimmten Marker-Rescue-Platte, ermittelt in restriktiven Plaquetests mit verschiedenen Verdünnungen von deren Rohextrakt. Die Anzahl an Plaques auf einer solchen Platte selbst (direkt), ist jeweils in der Spalte darüber aufgeführt.

Tab.5:

DNA Sorte	ohne	mock	ts	wt	
plaques/ Platte direkt	0	0	0	40	
pfu/ Platte	0	0	0	2×10^4	
DNA Sorte	ts +EcoA	ts +HpaA	ts +SalC	ts +Hind B	ts +Bam D
plaques/ Platte direkt	kein Ergebnis		20	kein Ergebnis	5
pfu/ Platte	2×10^3	2×10^3	3×10^3	$1{,}5\times10^1$	1×10^4

4.3. Auswirkung der Mutation bei H2 ts206 auf den Ablauf des viralen Infektionszyklus

Untersuchungen im Zusammenhang mit der Isolation der Mutante haben gezeigt,daß der temperatursensitive Schritt sehr früh im Infektionszyklus eine Funktion hat(1,5 bis 4,5 Stunden nach Infektion bei 32°C), daß es sich aber bei H2 ts206 nicht um eine Adsorptions- oder "uncoating"-Mutante handelt(Kathmann et al.,1976).
Nach Adsorption und "uncoating" ist die virale RNA-Synthese der nächst-wichtige frühe Schritt im zeitlichen Ablauf des viralen Infektionszyklus.Es lag daher nahe,zunächst experimentell festzustellen, ob und wenn inwiefern die Produktion viraler RNA unter restriktiven Bedingungen beeinträchtigt ist bei H2 ts206.

4.3.1. Mutante-induzierte RNA in Kern und Zytoplasma restriktiv infizierter Zellen

Es hat sich gezeigt,daß nur Nachweismethoden mit sehr hohem Auflösungsvermögen dem System gerecht werden können.
Die Schwierigkeit bestand zum Teil darin,daß weniger als ein Promille der zu frühen Zeiten nachweisbaren RNA nach Adenovirusinfektion viralen Ursprungs ist (Wilson et al.,1979,Übersichtsartikel:Nevins und Chen Kiang,1981).Zu diesem Zeitpunkt ist die zelluläre RNA-Synthese noch nicht beeinträchtigt und die virale läuft in sehr geringem Umfang an;einerseits

weil zunächst nur katalytische Funktionen in katalytischer Menge abgerufen werden,die dann andererseits erst die Voraussetzungen schaffen für virale Produktion in großem Umfang.
Ein Ausgleich dafür könnte durch hohe Multiplizität der Infektion erreicht werden.Gerade das verbietet sich aber für das untersuchte System,weil als Folge einer solchen Maßnahme der Mutantencharakter verloren ginge(s.4.1.2).Eine ausreichende Menge an HeLa-Zellen mußte also mit möglichst niedriger Multiplizität infiziert werden,um genügend Material für die Weiterarbeit zu erhalten.Dadurch war erreicht,daß der virusspezifische Anteil an Mutante-induzierten Präparationen auch überwiegend Mutante-spezifisch war.Das Problem allerdings,daß der weitaus grösste Anteil der RNA-Präparationen Wirtszellcharakter aufweist,bleibt bestehen.Von einer Anreicherung des viralen Anteils,zum Beispiel mit Hilfe von Affinitätschromatographie,wurde abgesehen, um einen möglicherweise negativen Nachweis nicht über zu viele verlustreiche Schritte zu führen.
Im folgenden Text ist mit der Bezeichnung nukleare (zytoplasmatische) wt-,ts-, oder mock-RNA gemeint: RNA,isoliert aus Kernen(Zytoplasma) restriktiv infizierter HeLa-Zellen zu frühen Zeiten nach Infektion mit Ad2 Wildtyp-,oder H2 ts206,oder ohne Viruspräparation.Bedingungen für Infektion und RNA-Anreicherung sind in 3.13 angegeben.

4.3.2. Flüssigkeitshybridisierungen

RNA,isoliert aus Kern und Zytoplasma restriktiv mit Wildtyp,Mutante oder nicht infizierter Zellen wurde im Überschuß(1-2mg/ml) hybridisiert gegen tritiummarkierte Ad2 DNA(1µg,$5x10^6$cpm).Aliquots wurden entnommen vom Beginn der Hybridisierungsreaktion an bis zu deren Maximum nach 3 Stunden, mit Hilfe von S_1Nuklease von unreagierter Radioaktivität befreit und der Anteil noch säurefällbarer Radioaktivität ermittelt(3.16.).Es zeigte sich,daß die Methode unter den genannten Bedingungen eine zu geringe Auflösung hat,um den geringen Anteil virusspezifischer RNA in "früh" infizierten Zellen nachweisen zu können.Auch nach einer Inkubationszeit von drei Stunden konnte mit keiner der eingesetzten RNA-Präparationen,auch nicht mit der des Wildtyps,ein Doppelstranganteil nachgewiesen werden,der über "Hintergrunds"-Hybridisierungswerte (mit RNA aus uninfizierten Zellen) hinausging. Der Anteil an radioaktiver Ad2 DNA,der durch die Hybridisierung mit"spezifischer"wie mit unspezifischer RNA resistent wurde gegen S_1Nukleaseabbau, ergab immer Werte um 2000cpm.Spätere Versuche mit "später" RNA aus wildtypinfizierten Zellen führten zu etwa 40000cpm Doppelstranganteil aus der Kern- und etwa 80000cpm aus der Zytoplasmafraktion. Entsprechende RNA-Präparationen aus uninfizierten Zellen gaben wiederum nur Anlaß zu Werten um 2000cpm. Die Methode konnte,so wie sie angewendet wurde, zwar sehr deutlich den Viruscharakter "später" RNA-Präparationen nachweisen,war aber nicht differenziert genug,um dem entsprechenden frühen System gerecht werden zu können.

4.3.3. Hybridisierungen gegen filtergebundene,unfraktionierte DNA

Untersucht wurde wieder "frühe" RNA aus Kern- bzw. Zytoplasmafraktionen wildtyp-,mutante- oder nicht infizierter Zellen.Die Hybridisierung erfolgte mit in vivo tritiummarkierter RNA(3.14) gegen einen Überschuß an Ad2 DNA,die ultraschallbehandelt und denaturiert auf runden Membranfiltern(Schleicher und Schüll,25mm,Porengrösse 0,2µm) immobilisiert war(3.15).Pro Filter mit 5µg DNA wurden 80000cpm markierter RNA eingesetzt. Unspezifisch gebundene RNA wurde nach der Hybridisierung durch Behandlung mit RNAase A und ausgiebiges Waschen beseitigt und dann die festgehaltene Radioaktivität ermittelt.Das Ergebnis ist in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab.6:

RNA Quelle	Infektion	cpm/Filter	%wt
Kern	wt	209	100
Kern	ts 206	362	173
Kern	mock	101	48
Zytoplasma	wt	460	100
Zytoplasma	ts 206	46	10
Zytoplasma	mock	55	12

Nukleare RNA der Mutante hybridisierte fast doppelt so stark wie Kern-RNA der Wildtypfraktion. Zytoplasmatische RNA aus der Mutante-Fraktion dagegen überschritt die Kontrollhybridisierungswerte aus Versuchen mit RNA aus uninfizierten Zellen nicht .Die entsprechende Wildtyp-RNA-Fraktion dagegen hybridisierte besonders stark.
Die Ausbeuten an hybridisierter RNA mit dieser Methode entsprechen den Literaturwerten(Green et al.,1969,Ortin und Dörfler,1975).
In Bezug auf die niedrigen Hybridisierungswerte ausgehend von zytoplasmatischer Mutante-RNA läßt die Methode keine eindeutige Aussage zu. Angesichts der -absolut gesehen- ebenfalls nicht hohen Wildtypwerte (nur etwa 4xKontrollhyb.) ist nicht zu entscheiden,ob im Zytoplasma mutanteinfizierter Zellen wirklich keine virusspezifische RNA vorliegt.Um zu untersuchen,ob dort nicht vielleicht doch geringe Mengen viraler Transkripte -wie sie allein schon aufgrund der "leakyness" der Mutation unter den angegebenen Bedingungen zu erwarten wären- induziert werden, mußten also andere Methoden herangezogen werden.

4.3.4. "Northern-blot"-Hybridisierungen

RNA-Präparationen wie in 4.3.2 und 3 wurden denaturiert und auf Formaldehyd- bzw. Glyoxal-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt;anschließend auf Nitrozellulosefilterpapier übertragen,eingebacken und gegen ^{32}P-markierte Wildtyp DNA ($1x10^8$cpm/µg) in einem ausreichenden Volumen einer Formamid-Salz-Lösung bei 45°C hybridisiert. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde unter stringenten Bedingungen abgewaschen,die Filter getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen (3.17.1 bis 3).
In allen Versuchen zeigte sich,daß Kern-RNA der Mutante -isoliert unter restriktiven Bedingungen- sehr viel stärker hybridisiert als die entsprechende Wildtyp-RNA(Abb. 7a).In keinem Fall erfolgte Hybridisierung mit RNA aus uninfizierten Zellen. Schwärzung auf den Autoradiogrammen bedeutet also immer Hybridisierung mit virusspezifischer RNA.
Es erwies sich als sehr schwierig,die RNA-Präparationen elektrophoretisch in Banden von Molekülen gleicher Länge aufzutrennen.Dafür sind mindestens drei Ursachen denkbar.
Zum Einen ist die RNA-Population besonders im Kern sehr heterogen;dann war die Denaturierung vor und während der Elektrophorese sicher beeinträchtgt durch die grosse Menge an RNA,die aufgetragen werden mußte,um später eine spezifische Hybridisierung sichtbar zu machen.Sobald die Hybridisierungsbedingungen nicht mehr 100% stringent waren,kam es wohl infolge der hohen Konzentrationen

zu Wechselwirkungen zwischen den Molekülen
und zu unspezifischem Laufverhalten. Außerdem
ist nicht nur während des Anreicherungsprozesses
die Gefahr sehr groß, RNA zu degradieren
-mechanisch, chemisch oder durch RNAaseeinwirkung-
sondern auch während der Verfahren zu elektro-
phoretischer Auftrennung und Hybridisierung.
Die Gefahr alkalischer Degradierung bergen besonders
die notwendig sehr strengen Denaturierungsbedingungen
en in sich. Lösungen wie Formaldehyd, Formamid
und Glyoxal müssen hochkonzentriert und zum
Teil bei hohen Temperaturen über einen längeren
Zeitraum eingesetzt werden, um vollständige
Denaturierung zu erlangen. Auch wenn diese Stoff
fe hochgereinigt vorliegen, treten leicht alka-
lische Zerfallsprodukte auf, besonders auch während
der Elektrophorese, wenn die Puffersalze ebenfalls
elektrophoretisch aufgetrennt werden, und die
Temperatur während des Laufes ansteigt.
Während Formaldehydgele nur verwischte Banden lie-
ferten und die RNA-Präparationen zum Teil als
degradiert erschienen, konnte nach Glyoxaldenaturie-
rung in sichtbaren Banden aufgetrennt werden.
Auch Kern-RNA der Mutante, die offenbar in weit
übernormaler Menge in infizierten Zellen vorliegt,
ließ sich so in distinkten Banden auftrennen (Abb. 7b)
Sie besteht also nicht oder nicht nur aus willkür-
lich synthetisierten Molekülen statistischer Länge
sondern aus Molekülpopulationen mit gemeinsamen
Eigenschaften. Ausgehend von den beschriebenen Ver-
suchen kann man keine Größenunterschiede zwischen
Wildtyp- und Mutante-RNA-Präparationen feststellen.

Quantitativ erscheint die Mutante-RNA aus dem Kern als die weitaus stärkste Fraktion,die Mutante-RNA aus dem Zytoplasma als die weitaus schwächste;wobei deren Anteil quantitativ auch nur dem Phänotyp der "leakyness" von H2 ts206 entsprechen könnte,wie er unter den angewendeten Infektionsbedingungen auftritt(3.13).Eine Untersuchung der Autoradiogramme im Mikrodensitometer löste die Unterschiede in der Menge virusspezifischer RNA der vier RNA-Präparationen besonders deutlich auf(Abb. 8).

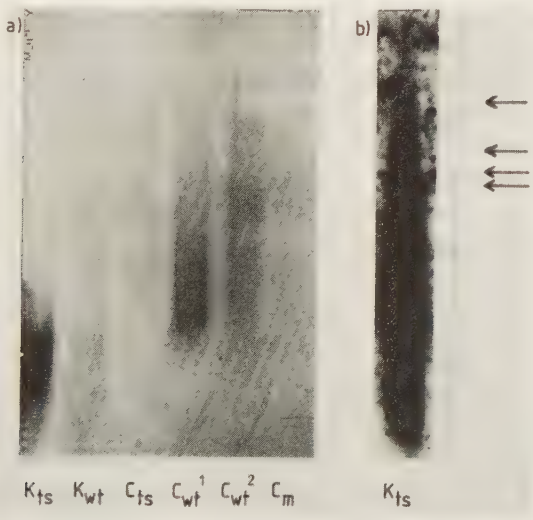


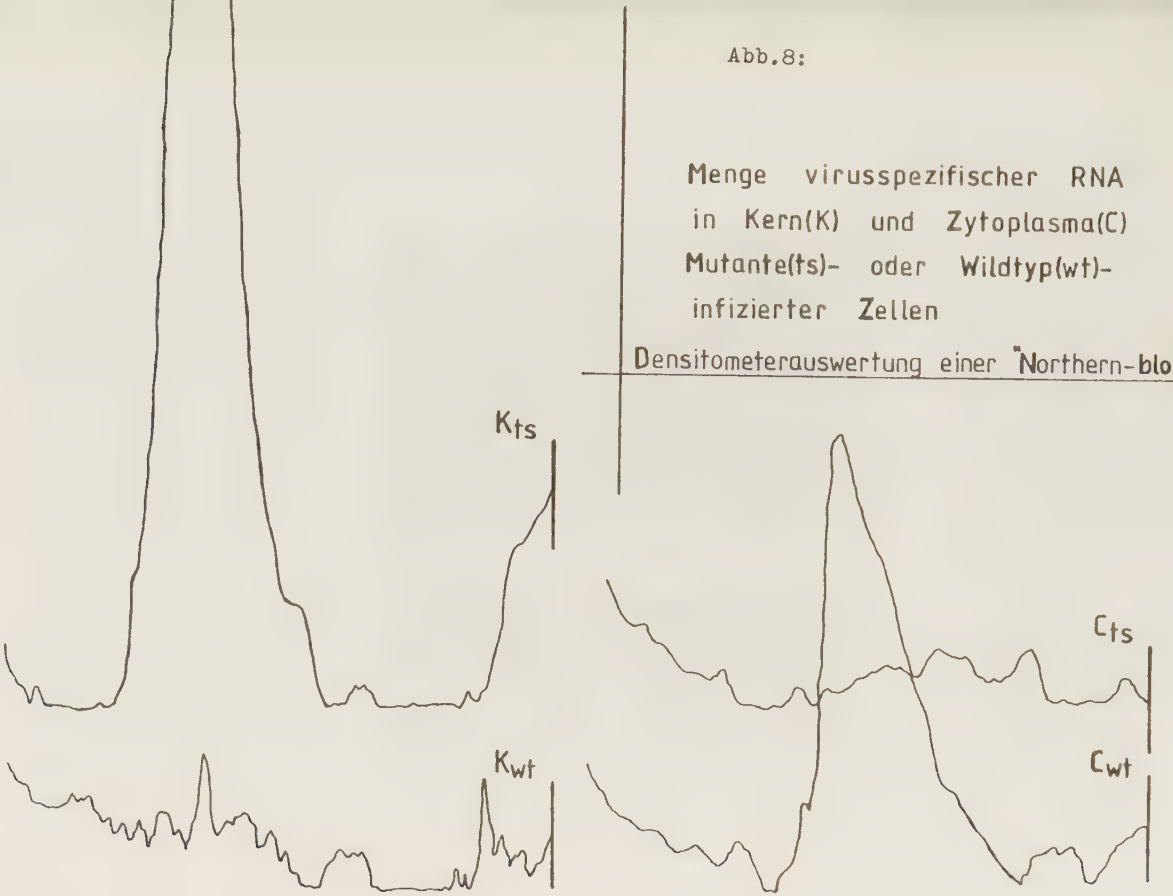
Abb.7,a) und b):

Autoradiogramme von Northern-Blot-Hybridisierungen ausgehend von Formaldehyd (a)- und Glyoxal (b)-gelen.Abgebildet sind getrennte,filtergebundene und gegen ^{32}P-markierte Ad2-DNA hybridisierte RNA-Populationen,die isoliert wurden aus Kern (K) und Zytoplasma (C) restriktiv mit H2ts206 (ts), Ad2 (wt) und ohne Viruspräparat (m) infizierter HeLa-Zellen.Die Indices 1 und 2 bezeichnen gleiche Isolate unterschiedlichen Datums.Die Position von Banden nuklearer Mutante-RNA aus den Glyoxalgelen ist mit Pfeilen markiert.

Abb.8:

Menge virusspezifischer RNA in Kern(K) und Zytoplasma(C) Mutante(ts)- oder Wildtyp(wt)-infizierter Zellen

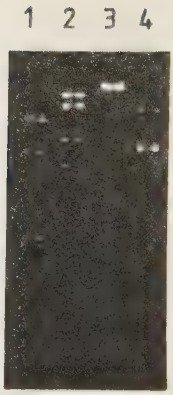
Densitometerauswertung einer "Northern-blot"-Hybrid.



4.3.5. "Southern-blot"-Hybridisierungen

Virale Wildtyp-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut, auf Agarosegelen aufgetrennt (Abb. 9), auf Nitrozellulosepapier übertragen und gegen die beschriebenen RNA-Präparationen hybridisiert (3.18., 4.3.). Zu diesem Zweck waren je 5µg einer RNA-Sorte mit Polynukleotidkinase markiert worden (3.18.3.) zu einer spezifischen Aktivität von $1\text{-}5 \times 10^8$ cpm/5µg, und wurden auch in dieser Menge eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte ungefähr zwei Tage lang im Schüttelwasserbad bei 42°C. In einem anschließenden ausgiebigen Waschvorgang wurden die Filter von unspezifisch gebundener Radioaktivität befreit.
Die Autoradiogramme so behandelter Nitrozellulosefilter erhärteten ebenfalls den Befund, daß -charakteristisch für die H2ts206 Mutation- nur weit unternormale Mengen viraler RNA im Zytoplasma infizierter Zellen nachweisbar sind (Abb. 10b). Das schwache Hybridisierungsmuster ausgehend von dieser RNA-Sorte stimmte auf den ersten Blick qualitativ überein mit dem der entsprechenden Wildtypfraktion. Bei genauerem Hinsehen wird aber deutlich, daß bestimmte Banden sehr viel stärker vertreten sind, wenn man das Verhältnis der Bandenintensitäten der entsprechenden zytoplasmatischen Wildtyphybridisierung zugrundelegt. Die äußerst geringe Menge zytoplasmatischer Mutante-RNA, wie sie sich in allen Versuchen bestätigt hat, unterscheidet sich also, anders als zunächst erwartet, auch qualitativ von der Wildtyppopulation.

Abb.9:
Agarose-Gele mit getrennten, Ethidiumbromid-gefärbten Ad2-Restriktionsfragmenten vor der Southern-Blot-Übertragung.Die Kanäle 1 bis 4 bezeichnen Ad2-DNA, fragmentiert mit:
HindIII(1),BamHI(2),EcoRI(3),XhoI(4).



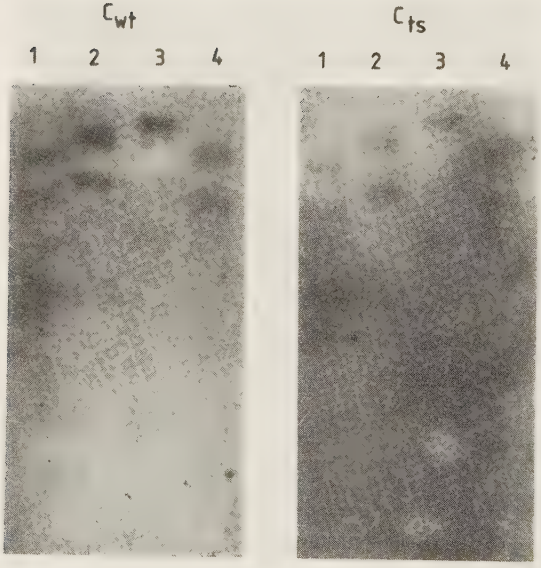
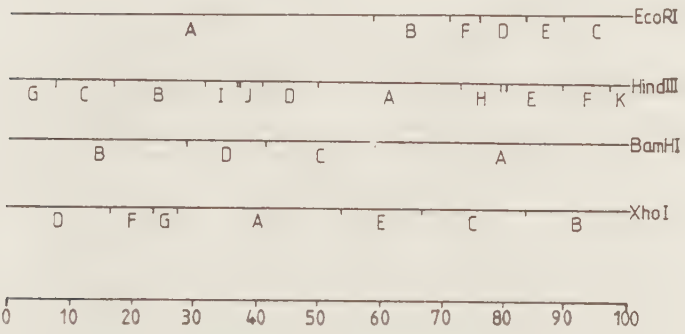


Abb.10b: Autoradiogramme von Southern-Blot-Hybridisierungen gegen zytoplasmatische RNA (C),isoliert nach restriktiver Infektion mit H2ts206 (ts) oder Ad2 (wt). Abgebildet sind Ad2-Restriktionsfragmente,getrennt auf Agarosegelen (Abb.9),übertragen auf Nitrozellulosefilter und hybridisiert gegen ^{32}P-markierte zytoplasmatische Mutante(C_{ts})- oder Wildtyp(C_{wt})-RNA-Fraktionen.
Die Kanäle 1 bis 4 entsprechen identisch denen in Abbildung 9.

Eine Auflösung der Bandenstärken im Mikrodensitometer verdeutlichte diesen Befund(Tab. 7).
Die erhaltenen Daten weisen die,über den "background" hinaus vertetenen,Banden zytoplasmatischer Mutante-RNA einem genomischen Bereich zu, der durch die folgenden Fragmente repräsentiert ist: EcoRI A;HindIII D und F,G;BamHI (B) und C; und XhoI (A) und (B,C,D),(nicht eindeutig markierte Fragmente in Klammern,Ad2 Fragmentierungskarte dazu:Abb. 11).

Abb.11:



Der gemeinsame,RNA-komplementäre Bereich dieser Fragmente ist gekennzeichnet durch das HindIII D-Fragment zwischen Pos. 41 und 50 und das HindIII G-Fragment zwischen Pos. 0 und 7,7 auf dem viralen Genom.Beide Fragmente sind zwar nicht sehr gut,oder gar nicht trennbar von Nachbarfragmenten (s.Abb. 9),aber jedes ist doch eindeutig ausgewiesen.Aus der Gruppe HindIII C,D,E sind die

Positionen noch optisch auflösbar(jew. ca 2mm voneinander getrennt,deutlich in Abb.10a,K_{ts} und Abb. 9),und ein charakteristisches Verhältnis zur Laufstrecke der A-Bande ist für jedes einzelne Fragment zu ermitteln.
Daraus geht eindeutig hervor,daß nur das HindIII D-Fragment aus der C,D,E-Gruppe komplementär ist zu mutantetypischer RNA aus dem Zytoplasma infizierter Zellen.Außerdem wird diese Komplementarität deutlich bestätigt durch die des BamHI C-Fragments. Daß die Hybridisierung der optisch nicht auflösbaren HindIII F,G-Gruppe ausschließlich auf das G-Fragment zurückzuführen ist,geht aus dessen "Bestätigung" durch Fragmente aus den anderen Verdauungen hervor. Eine zusätzliche Komplementarität des HindIII F-Fragments (Pos. 90 bis 97) müsste eine Bestätigung erfahren durch gleichzeitige Hybridisierung mit dem EcoRI C-Fragment (Pos. 90 bis 100).Das ist nicht einmal andeutungsweise der Fall.
Im Zytoplasma mutanteinfizierter Zellen treten spezifisch für die H2 ts206 Mutation also nur RNA-Sequenzen aus dem Bereich zwischen Pos. 0 und 8 und zwischen Pos. 41 und 50 des viralen Genoms auf. RNA aus dem Kern mutanteinfizierter Zellen,die in allen Versuchen einen übernormal hohen virusspezifischen Anteil gezeigt hat,ist offenbar ebenfalls gekennzeichnet durch eine andere Verteilung der Genomzugehörigkeit als Wildtyp RNA.
Das ist in diesem Fall schon deutlich sichtbar an den Autoradiogrammen(Abb.10a), und wird noch einmal bestätigt durch deren Auswertung im Mikrodensitometer(Tab. 7).

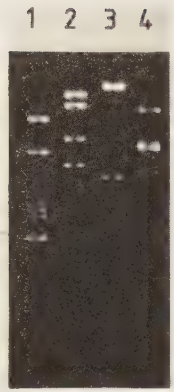


Abb.9:

Agarose-Gele mit getrennten, Ethidiumbromid-gefärbten Ad2-Restriktionsfragmenten vor der Southern-Blot - Übertragung.Die Kanäle 1 bis 4 bezeichnen Ad2-DNA, fragmentiert mit:

HindIII(1),BamHI(2),EcoRI(3),XhoI(4).

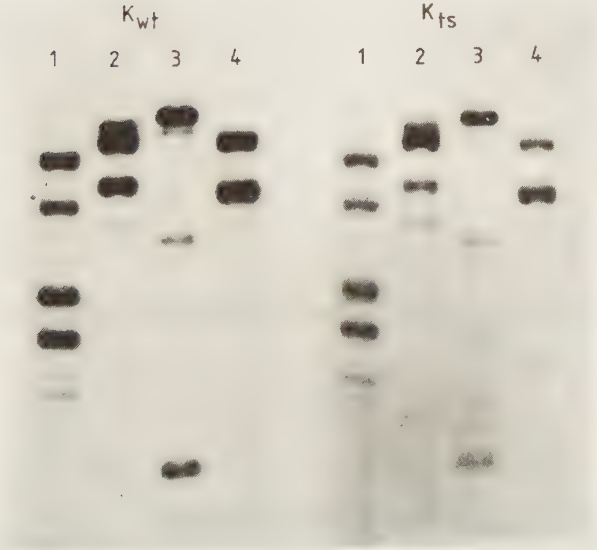


Abb.10a: Autoradiogramme von Southern-Blot-Hybridisierungen gegen nukleare RNA (K),isoliert nach restriktiver Infektion mit H2ts206 (ts) oder Ad2 (wt).
Abgebildet sind Ad2 Restriktionsfragmente,getrennt auf Agarosegelen (Abb.9),übertragen auf Nitrozellulosefilter und hybridisiert gegen ^{32}P-markierte nukleare Mutante(K_{ts})- oder Wildtyp(K_{wt})-RNA-Fraktionen.
Die Kanäle 1 bis 4 entsprechen identisch denen in Abbildung 9.

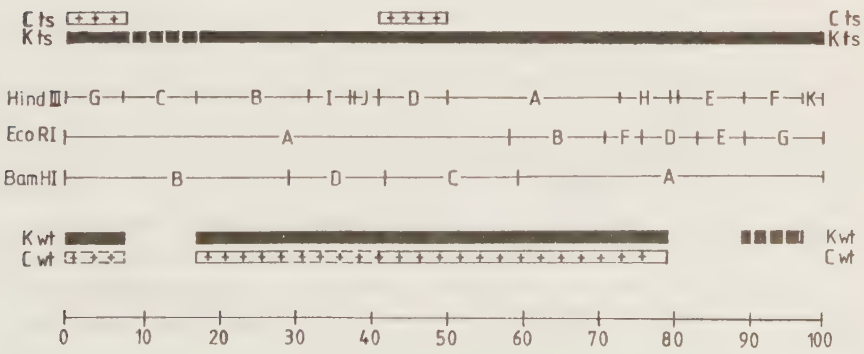
Ad2 Restriktions-fragmente		RNA-Sorte K_{wt}	K_{ts}	C_{ts}	C_{wt}
HindIII	A	6,5	3,3	0,36	1,45
	B	5,2	3,45	0,45	1,76
	C	-	Schulter		
	D	7,1	3,55	1,49	1,22
	E	-	Schulter		
	F G	6,24	3,38	1,22	0,28
	H	0,99	0,77	-	0,15
	I	-	0,15	-	-
BamHI	A	Schulter	Schulter	-	Schulter
	B	11,2	9	0,59	1,9
	C	6,5	2,1	0,9	0,87
	D	0,51	0,72	-	0,18
EcoRI	A	10,4	15	1,05	3,0
	B	1,65	1,3	-	0,1
	C	-	0,7	-	-
	D	-	0,54	-	-
	E	-	0,21	-	-
	F	5	2,52	-	-
XhoI	A	8,25	4,5	0,6	0,8
	B C D	12,4	7,8	0,2	1,15
	E	-	1,1	-	-
	F	0,05	0,6	-	-
	G	0,25	0,1	-	-

Tab. 7 :Auswertung der Southern-blot-Hybridisierungen im Mikrodensitometer.Angegeben ist überschlagsmäßig die Fläche(cm^2) unter Schwärzungsgipfeln, ausgehend von der Hybridisierung der einzelnen Fragmente mit jeder der 4 RNA-Fraktionen(4.3.5)

Mutante-RNA aus Kernen infizierter Zellen zeigt nicht wie nukleare Wildtyp-RNA Komplementarität nur zu einem beschränkten Teil des viralen Genoms, sondern deckt offenbar das gesamte Genom ab.Das wird besonders deutlich an der unterschiedlichen Hybridisierung beider RNA-Präparationen an die EcoRI-Fragmente.Nukleare Mutante-RNA hybridisiert deutlich gegen alle Fragmente,während Wildtyp-RNA nur die Fragmente A,B und F abdeckt.Auch nach langen Expositionszeiten der Autoradiogramme erscheint dieser Unterschied unverändert.

Die virale RNA-Verteilung in mutante- und wildtyp-infizierten Zellen(Kern,Zytoplasma) als Ergebnis der Southern-Blot-Hybridisierungen ist zusammenfassend in Abbildung 12 dargestellt.

Abb.12:



schwarze Balken ▬ : nukleare RNA,wildtyp-(wt),oder mutante-(ts) spezifisch

helle Balken ▭ : entsprechende zytoplasmatische RNA

unterbrochene Balken deuten Regionen besonders schwacher Hybridisierung an.

5. Diskussion

Der Begriff "nukleare" oder "zytoplasmatische" "Mutante (Wildtyp,mock)-RNA" ist im weiteren gebraucht im Sinn von GesamtRNA,isoliert aus Kern oder Zytoplasma restriktiv infizierter HeLa-Zellen zu frühen Zeiten nach entsprechender Infektion.

5.1. Der Genotyp der Mutante H2 ts206

H2 ts 206 ist eine der temperatursensitiven "frühen" Adenovirus Typ2 Mutanten,die von Kathmann et al.(1976) nach chemischer Mutagenese isoliert werden konnten. Die ts206 Mutation bestätigte sich als besonders "leaky",das bedeutet in diesem Fall die Infektiosität der Mutante war bei der nicht permissiven Temperatur nur um etwas mehr als ein Drittel eingeschränkt. So war sie,wollte man eindeutige Effekte nachweisen (auch für eine frühe Mutante) besonders schwierig zu handhaben ,schien aber auch besonders interessant zu sein:Kathmann et al.(1976) hatten festgestellt, daß der temperatursensitive Schritt bei H2 ts206 besonders früh,schon in den ersten Stunden nach Infektion zum tragen kommt,es sich aber nicht um einen Defekt bei Adsorption oder "uncoating" handelt. Das deutete auf eine Fehlfunktion eines der ersten virusbeeinflussten Mechanismen im Infektionszyklus hin und der Gedanke lag nahe,die virale Transkription oder die Modifikation viraler Transkriptionsprodukte könne beeinträchtigt sein.
Der Mutationsort,der der temperatursensitiven Funktion zugrundeliegt,konnte in dieser Arbeit einem Bereich zwischen Position 29,3 und 31,7 auf dem viralen Genom zugeordnet werden(siehe auch Abb. 6).

Dazu wurden gereinigte Wildtyp-DNA-Fragmente aus Inkubationsansätzen mit jeweils unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen zusammen mit isolierter DNA transfiziert und -bei der restriktiven Temperatur- das Auftreten von Plaques im HeLa-Zellrasen beobachtet.Während eine solche Kotransfektion(marker rescue) mit den Fragmenten SalI C,BamHI D,EcoRI A und HpaI A im gleichen Umfang ein Wildtypwachstum herbeiführte,zeigte das "erfolgreiche" Fragment aus der HindIII-Verdauung,das B-Fragment,eine stark verminderte Fähigkeit dazu(Tab. 5).
Die Schnittstelle bei Pos.31,7 auf dem HindIII B-Fragment legt zusammen mit der Schnittstelle bei Pos.29,3 auf dem BamHI D-Fragment gemeinsamen Bereich aller "erfolgreichen" Fragmente auf dem viralen Genom fest(Abb. 6).
Es ist erwiesen,daß ungeschützte,lineare DNA in eukaryontischen Zellen besonders instabil ist(Teifel, 1976).Läge also die Entsprechung des Mutationsortes auf dem HindIII B-Fragment sehr nahe an dessen Ende bei Position 31,7 ,so wäre damit die geringe Komplementationseffizienz mit diesem Fragment erklärlich: Es brächte zwar,alleine unter den HindIII-Fragmenten eine Wildtypentsprechung des Mutationortes in die Zelle ein.Eine "erfolgreiche" Rekombination mit dem Mutantengenom käme aber selten zustande, da der wichtige Abschnitt am Ende des Fragments besonders anfällig für Nukleaseabbau wäre,oder möglicherweise sogar beim Rekombinationsprozess selbst verloren ginge.Damit wäre auch erklärt,warum keines der anderen "erfolgreichen" Fragmente von einer solchen Reduktion betroffen ist.

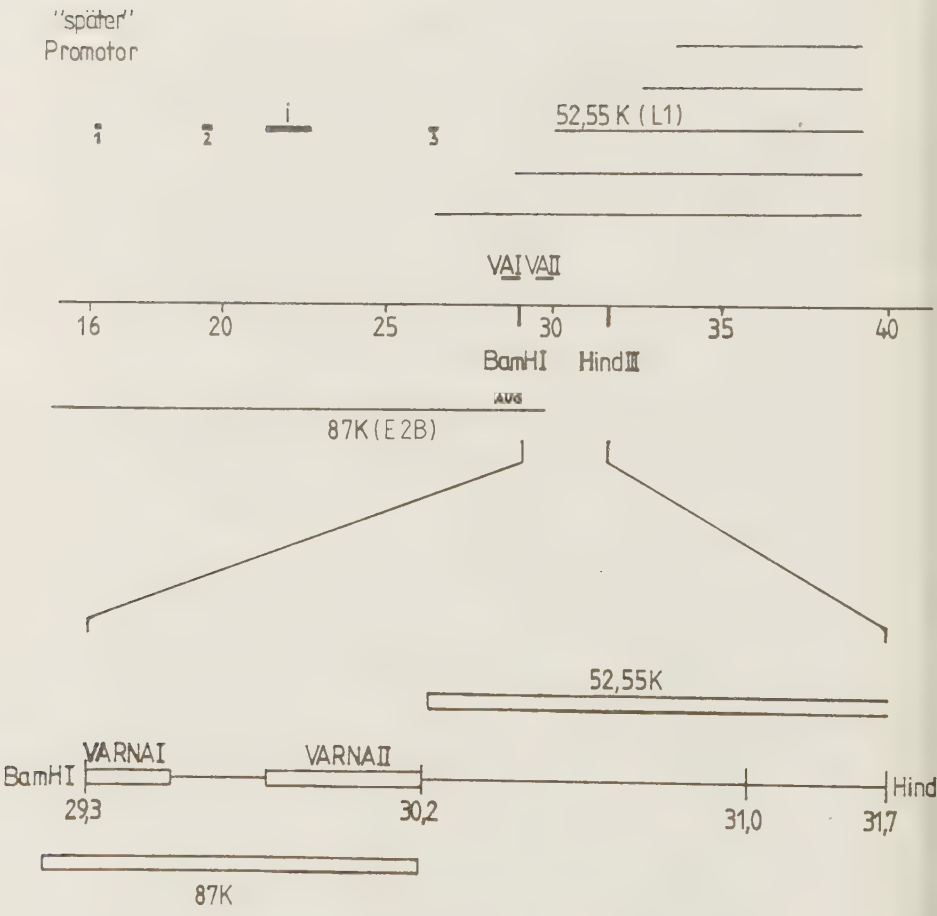


Abb.13:

Transkriptionskarte der Region um den Mutationsort von H2ts206. Der Bereich zwischen BamHI- und HindIII-Schnittstelle bei Pos.30,dem die ts206-Mutation zugeordnet werden konnte,ist vergrössert dargestellt.Linien,bzw Balken geben zytoplasmatische RNA-Sequenzen an.Kodierende Transkripte sind charakterisiert durch das Molekulargewicht ihrer zugeordneten Translationsprodukte und,in Klammern,durch die Bezeichnung der zugehörigen Transkriptionseinheit.

(Vollständige Karte,Abb.14)

In dem durch die marker rescue-Versuche gekennzeichneten Bereich zwischen Pos.29.3 und 31,7 auf dem viralen Genom kodieren folgende Funktionen(Abb.13):

auf dem viralen r-Strang:

VA RNAI von Pos.29,1 bis 29,5
VA RNAII von Pos.29,8 bis 30,2

das EL Primärtranskript(AUG für das L1 52,55kd Protein bei Pos. 30,24)

auf dem viralen l-Strang:

der E2B Präkursor (AUG für das 87kd Protein bei Pos.28,9) (in diesem Fall liegt der Mutationsort nicht im kodierenden Bereich,sondern im Intron davor an dessen 5'Ende nahe der Spleisstelle)

Außerdem sind die offenen Leseraster unbekannter Bedeutung 4 und 6 ganz oder teilweise in der identifizierten Sequenz enthalten(alle Sequenzdaten aus Gingeras et al.,1982).

5.2. Der Phänotyp der Mutante H2 ts206

Um zu erfassen,ob wirklich die Transkription oder Modifikation von Transkriptionsprodukten vom Ausbleiben der mutierten Funktion bei ts206 betroffen sind,wurde frühe RNA aus restriktiv infizierten Zellen untersucht.Das übereinstimmende Ergebnis aus verschiedenen Hybridisierungen solcher RNA mit Adenovirus2 Wildtyp-DNA war überraschend. Im Kern mutanteinfizierter Zellen ließ sich eine wesentlich grössere Menge virusspezifischer RNA nachweisen als in der entsprechenden Wildtyp-RNA-Präparation(Abb.7 und 8).
Zu frühen Zeiten nach Infektion,besonders bei Anwendung niedriger Multiplizitäten der Infektion,macht virale RNA nicht einmal Promilleanteile an der RNA-Population in infizierten Zellen aus(Wilson et al.,1979,Nevins und Chen Kiang,1981), und ist entsprechend schwer nachzuweisen.So war auf einigen RNA-Filtern nach Hybridisierung gegen ^{32}P-markierte Wildtyp-DNA die einzig nachweisbare RNA-Fraktion das Isolat aus Kernen mutanteinfizierter Zellen.Auch wenn mit einer gleichen Menge der entsprechenden Wildtyp-RNA-Fraktion keine Schwärzung in der Autoradiographie nach Hybridisierung sichtbar wurde,war der Kanal mit nuklearer RNA aus Mutante-Infektionen jedesmal tiefschwarz. Isolate aus dem Zytoplasma infizierter Zellen lieferten dagegen eine wesentlich schwächere Hybridisierung der Mutante- als der Wildtypfraktion(Abb.7 und 8).
Der Unterschied war so deutlich,daß die geringe Menge mutanteinduzierter viraler RNA in der Zytoplasmafraktion auch nur auf die "leakyness" solcher Infektionen hätte zurückgeführt werden können.

Eine solche Vermutung könnte sich bewahrheiten,wenn markierte RNA aus dem Zytoplasma mutanteinfizierter Zellen sich bei einer Hybridisierung gegen filtergebundene aufgetrennte DNA-Fragmente qualitativ genau gleich verhielte wie die entsprechende Wildtyppräparation.Mutante-RNA sollte dabei ,wenn auch deutlich schwächer,so doch an die gleichen Fragmente binden mit dem gleichen Intensitätsverhältnis innerhalb der Fragmente einer Restriktionsverdauung.
Wären aber,quantitativ nicht erfassbar,bei der Mutante einzelne RNA-Spezies über die durch "leakyness" bedingte Hintergrundsmenge hinaus im Zytoplasma verteten,sollte das an einer unverhältnismässig stärkeren Hybridisierung gegen komplementäre DNA-Fragmente sichtbar werden.
Entsprechende Versuche bestätigten solche qualitativen Unterschiede nicht nur für die zytoplasmatische sondern -unerwarteterweise- auch für die nukleare Mutante-RNA (Abb.10a und b,Tab.7).
Um die genauen Ergebnisse der "Southern-" und "Northernblot"-Hybridisierungen unter den beschriebenen Bedingungen(3.17 und 18) einordnen zu können,muß man deren Aussagekraft mit in Betracht ziehen:
GesamtRNA aus virusinfizierten cycloheximidfreien Zellen wurde gegen Ende der frühen Phase isoliert.Weitere Untersuchungen damit gaben also Aufschluß über die Gleichgewichtsmenge der RNA-Population in der Zelle, die einerseits von der Transkriptionsrate,auf der anderen Seite von ihrer Stabilität bestimmt ist.
Es ist außerdem zu bedenken,daß das qualitative, bzw quantitative Auflösungsvermögen beider Hybridisierungsverfahren,so wie sie angewendet wurden, unterschiedlich ist : DNA Filter("Southernblot-

Hybridisierung) enthielten jeweils 1 bis 2 µg spezifisch fragmentierter DNA(bei geringeren Mengen wurde keine Hybridisierung sichtbar),also einen Überschuß verglichen mit der Menge virusspezifischer RNA im Hybridisierungsvolumen(weniger als 1ng). Hybridisierte RNA an den filtergebundenen Fragmenten erlaubt also wohl eine qualitative Aussage über den genomischen Ursprung viraler RNA-Sorten im Hybridisierungsvolumen,nicht aber über ihren Mengenanteil in der eingesetzten RNA-Fraktion.Sehr geringe Mengen spezifischer RNA werden außerdem nicht erfasst. Im Fall der"Northernblot"-Hybridisierung mit aufgetrennter filtergebundener RNA dagegen ist die Hybridisierungsintensität wirklich Maß des virusspezifischen Anteils in der aufgetragenen RNA-Fraktion. Sie wird durch den großen Überschuß virusspezifischer DNA im Hybridisierungsvolumen vollständig erfasst.

Aus Hybridisierungen mit filtergebundener RNA infizierter Zellen ging also hervor,daß im Kern eine grosse Menge mutanteinduzierter viraler RNA vorliegt -weit mehr als bei der entsprechenden Wildtyppräparation- aber nichts,oder nur ein winziger Anteil davon im Zytoplasma erscheint.
Die Hybridisierung solcher RNA-Fraktionen ließ dann für Kern- und zytoplasmatische Mutanten-RNA zu der starken quantitativen Abweichung vom Wildtypverhalten auch eine vom Wildtypmuster abweichende Genomzugehörigkeit erkennen:Im Gegensatz zur vergleichbaren Wildtypfraktion hybridisierte nukleare Mutante-RNA gegen alle angebotenen Fragmente innerhalb der Erfassungsgrenze der Methode(Abb. 10a, besonders deutlich bei den EcoRI- Fragmenten).

Die Hybridisierungsintensität beider nuklearer RNA-Präparationen war in diesem Fall etwa gleich, der sichtbare Unterschied im Hybridisierungsmuster also nicht auf den grösseren Mengenanteil virusspezifischer RNA in den Mutante-Präparationen zurückzuführen.
Versuche mit zytoplasmatischer RNA machten auf den ersten Blick keinen qualitativen Unterschied zwischen Mutante- und Wildtyp-Fraktion deutlich. Zytoplasmatische Mutante-RNA hybridisierte gegen genau die gleichen Fragmente wie die entsprechende Wildtyppräparation. Erst anhand der Auswertung im Mikrodensitometer(Tab.7), und dann auch bei genauerem Hinsehen wurde erkenntlich, daß bestimmte DNA-Fragmente besonders stark mit der Mutante-RNA-Präparation hybridisierten, abweichend vom Verhältnis der Bandenintensitäten des vergleichbaren Wildtypfilters. Diese überproportional repräsentierten Banden sind also nicht auf "Hintergrundshybridisierung" zurückzuführen, wie sie im Fall der restlichen Fragmente durchaus mit der "leakyness" der Mutante zu erklären ist. Sie sind im Gegenteil Ausdruck für das charakteristische Verhalten von H2 ts206 bei nicht permissiver Temperatur. Unter restriktiven Bedingungen produziert die Mutante demnach nicht nur einen großen Überschuß an nuklearer RNA, sondern entläßt davon, anders als zunächst erwartet, einen kleinen spezifischen Teil ins Zytoplasma. Während im Zytoplasma wildtypinfizierter Zellen RNA komplementär zu allen frühen Regionen nachweisbar war(einschließlich der EL Region, nur E4 liegt offenbar unter der Erfassungsgrenze), zeigte sich mutantespezifische Hybridisierung nur mit Fragmenten, die der E1 und der EL Region entsprechen.
In Bezug auf diese EL Region ist zu sagen, daß

die Ergebnisse aller Hybridisierungsversuche in einem Punkt abweichende Daten von den Literaturwerten erbrachten.
Die EL(early late)Region ist der Bereich auf dem viralen Genom,der ausgehend vom"späten" Promotor bei Position 16,3 zu frühen Zeiten transkribiert wird,in einem Umfang,wie er für frühe,nicht für späte Transkription charakteristisch ist(Nevins und Wilson,1981,Akusjärvi undPersson,1981).Von diesem Promotor aus wird ein Primärtranskript über die Regionen L1,2 und 3 erstellt(s.Abb.14). Wie zu späten Zeiten auch,bestimmen dabei endonukleotytische Schnitte am nascierenden Transkript, am Ende welcher der drei kodierenden Sequenzen ein PolyAA Ende angefügt wird.Nevins und Wilson (1981)konnten zeigen,daß dabei von den drei in gleicher Menge im Kern exprimierten Sequenzen nur mRNA-Transkripte komplementär zur L1 und L2 Region zu frühen Zeiten im Zytoplasma erscheinen.
Durch Pulsmarkierungen in Gegenwart von Cycloheximid kamen sie zu dem Ergebnis,daß zu diesem Zeitpunkt RNA der Region L1 bevorzugt polyadenyliert und quantitativ transportiert wird,wogegen die unterrepräsentierten PolyA$^+$L2-Transkripte offenbar auch einem beschränkten Transport unterworfen sind.
Im Gegensatz zu diesen Befunden war in der vorliegenden Arbeit im Zytoplasma nach Mutante- wie nach Wildtypinfektion nur die L2 Region(HindIII D Fragment) nicht aber die L1 Region(BamHI D Fragment) nachweisbar. Im Bereich der Region L2 gibt es kein weiteres frühes mRNA-Transkript,so daß die Zuordnung eindeutig ist. Der Unterschied ist auch nicht damit zu erklären,daß Nevins und Wilson Transkriptionsraten gemessen haben,

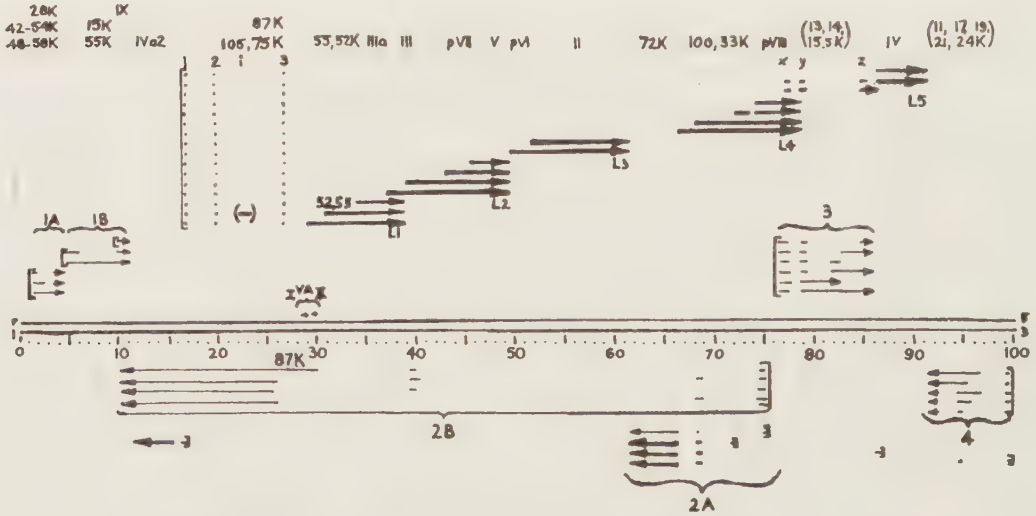


Abb.14: Genkarte Ad2-kodierter mRNA-Sequenzen und ihrer Proteine. Einfache Linien kennzeichnen früh, verstärkte Linien spät exprimierte Bereiche. Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an. Die Position der Promotoren ist durch senkrechte Klammern bezeichnet. Waagerechte Klammern fassen Transkriptionseinheiten einer Region zusammen. Zugeordnete Proteine sind durch ihr Molekulargewicht vertreten (K=1000d).

während hier Gleichgewichtsmengen virusspezifischer RNA erfasst wurden.Akusjärvi und Persson(1981) bestätigten durch Gleichgewichtsmessungen den Befund, daß die"späte" Region zu frühen Zeiten nach Infektion hauptsächlich durch mRNA aus dem Bereich L1 vertreten ist.
Alle diese Ergebnisse wurden allerdings in Gegenwart von Cycloheximid erzielt.Es ist bekannt,daß Proteinsyntheseinhibitoren nicht nur den Eintritt in die späte Phase verhindern,sondern auch -wenn sie erst nach Infektion eingesetzt werden- die geringe Menge virusspezifischer RNA,die man normalerweise zu frühen Zeiten nach Infektion finden kann,erheblich vergrössern (Parsons und Green,1971,Craig und Raskas,1974, Eggerding und Raskas,1978).Ob dabei auch eine Verschiebung im Mengenverhältnis der mRNA-Transkripte untereinander entsteht -etwa wenn nicht alle mRNA-Spezies gleichermassen auf diesen Stimulus ansprächen- ist nicht untersucht.
Eine mögliche,wenn auch nicht wahrscheinliche Ursache für das unterschiedliche Mengenverhältnis von L1 und L2 mRNA wäre auch die hohe Temperatur,bei der Infektionen in dieser Arbeit durchgeführt wurden,um restriktive Bedingungen zu schaffen.
Nevins und Wilson(1981) haben zusammen mit ihren Ergebnissen über die frühe RNA-Synthese in Gegenwart von Cycloheximid auch eine Tabelle mit Daten über nukleare RNA-Synthese in Gegenwart von Ara C veröffentlicht. Daraus geht hervor,daß der Einbau von ^{3}H-Uridin in der L2 Region deutlich erhöht erscheint gegenüber dem der L1 Region.
Welche Erklärung auch Gültigkeit hat,die Tatsache , daß in der vorliegenden Arbeit frühe L2 mRNA-Transkripte nachweisbar waren ,ist Ausdruck und Nachweis früher Syntheseaktivität ausgehend vom "späten"Promotor bei

Position 16,3.
Ausgehend vom "späten"Promotor -zu frühen wie zu späten Zeiten nach Infektion- erfolgt die RNA-Synthese von der L2 Region immer im Anschluß an eine L1-Transkription in aequimolarer Menge(in einem Präkursor). Wie schon erwähnt gilt es ausserdem als erwiesen, daß L1 Sequenzen zu frühen Zeiten im Zytoplasma infizierter Zellen auftauchen(Nevins und Wilson,1981, Akusjärvi und Persson,1981).So wird im weiteren der Nachweisvon L2 mRNA-Transkripten als Ausdruck für die gleichzeitige Anwesenheit von L1 mRNA behandelt, auch wenn diese selbst aufgrund ihrer niedrigeren Gleichgewichtsmenge(oder grösseren Instabilität bei der Isolation)nicht erfasst werden konnte.
Diesem Punkt kommt besondere Bedeutung zu,weil eine der beiden Regionen,die mutantespezifisch im Zytoplasma infizierter Zellen auftreten durch mRNA-Transkripte aus der E1 Region,die andere durch mRNA aus der L2 Region verteten ist.Aus der grossen Menge viraler RNA im Kern mutanteinfizierter Zellen treten also selektiv nur mRNA Transkripte aus dem Bereich E1 und EL im Zytoplasma auf (zusammenfassende Grafik: Abb.12).

5.3. Mögliche Ursachen für den Phänotyp von H2 ts206.Beziehung zum Mutationsort.

Worin besteht die Ursache,daß in restriktiv mit ts206 infizierten Zellen große Mengen nuklearer virusspezifischer RNA aus dem gesamten Genombereich akkumulieren,davon aber nur die Regionen E1 und EL mit mRNA-Transkripten im Zytoplasma vertreten sind?

Es ist wahrscheinlich,daß eine durch Punktmutation erzeugte temperatursensitive Mutante,deren Defekt sehr früh im Infektionszyklus zum tragen kommt,nur in einer viralen Funktion eingeschränkt ist.

H2 ts206 zeigt aber in Kern und Zytoplasma ein abweichendes,sogar qualitativ und quantitativ jeweils unterschiedlich abweichendes RNA Muster. Ist die oben genannte Prämisse richtig,so muß es ein Bindeglied geben,eine einzige virale Funktion, deren Ausfall beide Erscheinungsbilder zur Folge hat.Diese Funktion könnte zum Beispiel im zeitlichen Verlauf des Infektionszyklus zwischen beiden Erscheinungsbildern liegen,so daß ihr Ausfall die eine Erscheinungsform direkt zur Folge hätte,auf die andere dagegen zurückwirkte,so daß zwei unterschiedliche Effekte resultierten.Konkret betrachtet ergibt sich der folgende Zusammenhang:

Eine erhöhte Menge RNA im Kern tritt zusammen auf mit einer spezifisch erniedrigten Menge RNA im Zytoplasma,für beide Effekte sind jeweils zwei Ursachen denkbar,so daß vier Kombinationsmöglichkeiten resultieren:

prop.	Kern	Zytoplasma
$\frac{1}{(\text{Nukleaseabbau})(\text{Transport})}$	erhöhte Stabilität,	erniedrigte Stabilität
	erhöhte Transkriptionsrate	verhindertes Auftreten

Nur für eine der Kombinationen ist,wie gefordert, ein einziges Bindeglied wahrscheinlich: Der Transport, besser gesagt sein Ausbleiben für die Kombination erhöhte Stabilität im Kern und spezifisch,zum grössten Teil verhindertes Auftreten viraler mRNA im Zytoplasma.

Ein Ausbleiben des Transports kann seine Ursache in einem Fehler des Transportsystems selbst haben, oder in einem Defekt einer der Schritte, die nukleare Präkursoren erst zum Substrat für das Transportsystem machen. Der nachgewiesene qualitative Unterschied im Hybridisierungsverhalten nuklearer Mutante- und Wildtyp-RNA läßt beide Erklärungen zu: So könnten die im nuklearen Wildtyphybridisierungsmuster "fehlenden" Sequenzen in den Mutante-Kernen erfassbar sein, weil sie von dort nicht transportiert würden und somit eine erhöhte Gleichgewichtsmenge nuklearer Exons vorläge. Ein gleiches Bild ergäbe sich, wenn zusätzlich das Spleissen der Intron/Exon-RNA-Mosaike im Kern mutanteinfizierter Zellen ausbliebe.

Es sind viele Fälle bekannt, in denen falsch gespleisste RNA ins Zytoplasma transportiert wird, so zum Beispiel nach nicht permissiver Infektion von Affenzellen mit Adenovirus (Klessig und Chow, 1980) und bei manchen Formen von ßThalassämie (Busslinger et al., 1981). Aber es ist kein Fall bekannt, in dem ein Mosaikpräkursor ohne Spleissvorgang im Zytoplasma erschienen wäre. So bleibt in bestimmten, nicht permissiv mit SV 40 infizierten Teratokarzinomazellen nicht nur der virale Spleissvorgang aus, sondern es ist auch keine virale RNA im Zytoplasma nachweisbar. Montell et al. (1982) konnten zeigen, daß durch eine Mutation am Intron/Exon Übergang eines der Ad2 E1A-Transkripte nicht nur dessen Spleissung sondern auch sein Transport verhindert wurde. Auch die ausbleibende Modifikation von Primärtranskripten durch Spleissen könnte also -aufgrund einer mehr oder weniger engen Koppelung dieses Vorganges an den Transport- einen Phänotyp ähnlich dem der Mutante H2 ts206 zur Folge haben.

Verantwortlich wiederum für den Spleissdefekt könnte dabei jeder Prozessierungsschritt sein,der das Substrat für die Spleiss-Katalyse schafft. Möglicherweise also alle Modifikationen,die dem Spleissen vorausgehen,wie Cap-Formation,Transkript-methylierungen und Polyadenylierung.Neuere Erkenntnisse lassen jedoch die letzte Möglichkeit als unwahrscheinlich erscheinen:Nevins(1982)konnte zeigen, daß auch nicht polyadenylierte Präkursoren gespleisst und sogar transportiert werden,wenn sie auch im Zytoplasma wegen ihrer geringen Stabilität schwer nachweisbar sind.
Der geringe selektive Transport,der ins Zytoplasma H2 ts206-infizierter Zellen stattfindet,steht nicht im Widerspruch zur Theorie einer defekten viralen Funktion für den virusspezifischen Transport oder einer der Vorstufen dazu:
mRNA-Transkripte aus den Bereichen E1 und EL sind -in dieser Reihenfolge- die beiden ersten RNA-Spezies, die im Zytoplasma infizierter Zellen auftreten;ab einem Zeitpunkt,ungefähr eine Stunde nach Infektion (s.Adenovirus-Übersichtsartikel Persson und Philipson,1981).Die E1A mRNA-Transkripte werden dabei noch unabhängig von viralen Proteinen exprimiert,also auch in Gegenwart von Proteinsyntheseinhibitoren von Beginn der Infektion an.Die EL Region wird als nächste virale Region schon unter dem Einfluß einer Transkriptionsstimulation des E1A Produktes exprimiert(Nevins,1981). Da Adenoviren keine eigenen Enzyme in ihren Virionen mit in die Zelle einbringen,müssen die ersten viralen Funktionen vom noch unveränderten Syntheseapparat der Wirtszelle abgerufen werden.Die so verwirklichten Virusfunktionen dienen dann dazu,

das Wirtssystem selektiv auf virale Bedürfnisse umzustellen.Dazu gehört z.B.,im Verlauf des gesamten Infektionszyklus die Inaktivierung eines Repressors früher viraler Promotoren und,zu späten Zeiten,selektiver Transport und Translation viraler mRNA,Abbau zellulärer DNA und Nutzung der reaktivierten Bausteine für die virale DNA-Synthese.
Es ist wahrscheinlich,daß auch der zweiten viralen Funktion die exprimiert wird eine Aufgabe bei der Modulation zellulärer Mechanismen zukommt.
Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine virale Funktion hin,die direkt oder indirekt am Transport solcher viraler Transkripte,die nach der EL-Information im Zytoplasma erscheinen,beteiligt ist.
In einem entsprechenden Modell würden Transkription, Prozessierung,Transport und Translation vom noch unveränderten Wirtssystem verwirklicht.
Die Transkription der EL-Information liefe dann schon unter dem Einfluß der E1A-Funktion ab, Prozessierung,Transport und Translation erfolgten wieder wirtsspezifisch.Die weitere Transkription aller frühen Präkursoren liefe dann unverändert weiter,aber eine virale Funktion wäre von da an verantwortlich für den spezifischen Transport (vielleicht mit Wirkung auf den Spleissvorgang) aller weiteren viralen Transkripte.Fiele sie aus, so träten -zumindest bei niedrigen Multiplizitäten der Infektion- keine weiteren viralen RNA-Spezies mehr im Zytoplasma auf,und deren nukleare Vorläufer akkumulierten im Kern.Legt man einem solchen Zustand die Mutation von H2 ts206 zugrunde, so kommen die zu Anfang erwähnten drei viralen Funktionen als verantwortlich in Betracht.

In Bezug auf die E2B mRNA liegt die Mutation mindestens 150 bis 1000 Nukleotide vor dem 5'Ende der translatierbaren Sequenz und hätte damit höchstens für ein korrektes Prozessieren eine Bedeutung, wahrscheinlich aber auch dafür nicht.Außerdem wird die E2B Information erst zu späteren Zeiten im Infektionszyklus abgerufen und hat wohl schon aus diesem Grund für einen so frühen Defekt keine Bedeu-
Im Bereich der Mutation (Pos.29,3 bis 31,7,s.Abb.13) liegen möglicherweise noch das 5'Ende des L1 mRNA-Transkriptes,das zu frühen Zeiten für 52 bzw. 55kd Proteine kodiert und zur EL Region gehört,und die beiden kleinen virusassoziierten RNAs VA I und VA II.Die drei Sequenzen überlappen nicht,so daß wohl nur eine der drei Funktionen betroffen ist.
VA RNAs sind Polymerase III-Produkte und werden nicht translatiert,außerdem ist ihre Transkription unabhängig von viraler Proteinsynthese.Durch Versuche mit Proteinsyntheseinhibitoren zu Beginn der Infektion sollte es also möglich sein,den Defekt bei H2 ts206 genauer zuzuordnen.Resultiert ein solcher Versuch in einem RNA-Muster,wie es für die Mutante bei der restriktiven Temperatur charakteristisch ist,so wäre damit klar,daß die Mutation ebenfalls über den Ausfall eines Proteins zum tragen kommt.Damit wäre der Mutationsort der L1 Region als der einzig proteinkodierenden unter den drei möglichen zugeordnet.Ein dort kodiertes Protein müßte dann verantwortlich sein für den genannten Effekt bei virusspezifischem Transport.Bleibt ein derartiges Resultat jedoch aus,so gewinnt die Annahme Wahrscheinlichkeit,daß die Mutation eine der beiden VA RNAs betrifft,die in diesem Fall für die beschriebene

Transportfunktion verantwortlich sein müsste.

Solche Versuche mit Proteinsyntheseinhibitoren sind bereits durchgeführt(Lewis und Mathews,1980,Persson et al.,1981,Nevins,1981), und trugen maßgeblich zur Aufklärung der Adenovirus-E1A-Funktion bei.
Ein E1A-Protein stimuliert demnach spezifisch die Transkriptionsrate von frühen viralen Promotoren, wahrscheinlich durch Inaktivierung eines kurzlebigen zellulären Repressors:In Gegenwart von Proteinsyntheseinhibitoren läuft die virale Transkription unverändert ab(Lewis und Mathews,1980,Persson et al., 1981,Nevins,1981),virale mRNA-Transkripte ,ausgenommen von der E1A Region (EL nicht untersucht) erscheinen aber nur in reduziertem Umfang.
Die Angaben über das Maß dieser Reduktion schwanken von zwei- bis vierfach.Lewis und Mathews geben eine 200fache Reduktion an,beziehen das Ergebnis aber auf die erhöhten Werte,die resultieren,wenn Proteinsyntheseinhibitoren erst ein bis zwei Stunden nach Infektion wirksam werden.Das entspricht ungefähr einer vierfachen Reduktion relativ zur normalen Menge.
Drei Hauptpunkte sind also dem Erscheinungsbild einer restriktiven Infektion mit H2 ts206 und einer Infektion in Gegenwart von Proteinsyntheseinhibitoren gemeinsam:

Eine unveränderte RNA-Syntheserate,

ein unverändertes Auftreten der E1A mRNA (EL nicht untersucht),

eine reduzierte Menge der übrigen viralen mRNA.

Eine Abweichung besteht lediglich im Maß dieser Reduktion(mit PSI 4fach,bei ts 206 fast vollständig). Es ist also wahrscheinlich,daß ein defektes virales Protein,nämlich ein von der L1 mRNA kodiertes frühes Protein,für die Modulation des virusspezifischen RNA-Transportes der anderen frühen Transkripte verantwortlich ist.Darauf deutet auch die grosse Empfindlichkeit der Schnittstelle bei Pos. 31,7 bei den Marker-Rescue-Versuchen zur Kartierung hin (s.5.1).
Gegen eine Bedeutung der VA RNAs für die Transportfunktion sprechen zusätzlich neuere Befunde mit Deletionsmutanten,die jeweils eine der beiden RNA Spezies nicht exprimieren(Thimmapaya et al.,1982). In beiden Fällen konnten keine Auswirkungen auf RNA-Ebene festgestellt werden.VA RNAI scheint einen Einfluß auf der Ebene viraler Translation auszuüben.

Der quantitative Unterschied in der Reduktion zytoplasmatischer mRNA durch Proteinsyntheseinhibitoren oder den Defekt der Mutante ist vielleicht durch die unterschiedliche Multiplizität der Infektion,die in beiden Fällen angewendet wurde,zu erklären. Wegen der "leakyness" von H2 ts206 wurde mit nur etwa 10 pfu pro Zelle infiziert,während die Versuche mit Proteinsyntheseinhibitoren von jeweils 100 pfu pro Zelle ausgingen,wohl um die geringen Ausbeuten an früher viraler RNA zu erhöhen.Sobald ein virales Protein keine "Alles oder Nichts", sondern nur eine stimulierende Funktion hat,läßt sich seine Anwesenheit bei hohen Multiplizitäten der Infektion nicht mehr auflösen.Ein schönes Beispiel für so ein

Protein ist die Adenovirus E1A-Funktion,die auf dem 13 S mRNA-Transkript kodiert.
Deletions- und Punktmutanten aus diesem Bereich zeigenbei einer Multiplizität der Infektion von 10 bis 20 pfu pro Zelle keine virale Transkription, außer von der E1A Region im Fall der Punktmutante (Shenk et al.,1979,Nevins,1982).Bei etwa 50 pfu pro Zelle resultiert schon eine reduzierte Transkription (Jones und Shenk,1979) und bei 1000 pfu pro Zelle Wildtyptranskription,obwohl alle Nachkommen nach wie vor die Deletion aufweisen(Shenk et al.,1979, Nevins,1982).Transkription von den anderen frühen Regionen läßt sich zwar auch bei niedrigen Multiplizitäten nachweisen,da aber erst 35 Stunden nach Infektion,während im Normalfall die frühe Phase nach acht Stunden beendet ist.Wieder weisen alle Nachkommen die E1A Deletion auf(Shenk et al.,1979).
Die E1A Funktion übt also bei niedriger Multiplizität der Infektion einen stimulierenden Effekt auf die frühe Transkription aus,der in hochinfizierten Zellen,oder im Laufe einer stark verlängerten Inkubation kompensiert wird.
Solchen "nur" stimulierenden viralen Funktionen (ein anderes Beispiel ist die Rolle der VA RNAI für die virale Translation) könnte in vivo,d.h. im lebenden Organismus,durchaus eine "Alles oder Nichts"-Bedeutung für die Virusvermehrung zukommen.Die ersten entscheidenden Infektionszyklen laufen dort wohl immer mit niedriger Multiplizität,also langsam ab.Je schneller aber die virale Vermehrung vonstatten geht,desto grösser ist die Chance den Wettlauf mit der Immunantwort zu gewinnen und die Virusproduktion in Bereiche zu bringen,

in denen virale Stimulation und vielleicht auch Immunantwort keine grosse Bedeutung mehr haben. Die Existenz eines viralen Transporteffektors wird unter diesem Aspekt besonders wahrscheinlich, wenn man bedenkt wie ungünstig das Verhältnis transportierbarer RNA viralen und zellulären Ursprungs zu frühen Zeiten nach Infektion ist (In früh infizierten Kernen macht die Gleichgewichtsmenge viraler RNA höchstens Promillebruchteile am Gesamtbestand aus).
Es ist also sehr gut denkbar, daß die mutierte Funktion bei H2 ts206 in ihrer Wildtypentsprechung die Aufgabe hat, den viralen Transport -vielleicht gekoppelt an einen Spleissvorgang- zulasten zellulärer RNA zu stimulieren. Diese Funktion käme dann einem von der L1 Region kodierten Protein zu. Seine Wirkung würde durch die hohen Transkriptionsraten bzw grösseren Mengen an Transportsubstrat in hochinfizierten Zellen kompensiert, und mit Proteinsyntheseinhibitoren nur noch schlecht oder gar nicht mehr nachweisbar. Daß sehr lange Inkubationszeiten auch diesen Effekt kompensieren können, haben Kathmann et al. (1976) gezeigt, als sie ca 35 Stunden nach Infektion den ersten radioaktiven Einbau in virale DNA nachweisen konnten. Auch das spricht für einen stimulierenden Effekt der in H2 ts206 mutierten Funktion analog der stimulierenden Rolle des E1A Proteins (oder von VA RNAI für die Translation).
Im Fall von H2 ts206 ist es allerdings nicht möglich den Beweis durch hohe Multiplizitäten der Infektion zu erbringen, weil ein resultierender Wildtypcharakter ebenso auf die "leakyness der Mutation" wie auf der Kompensierbarkeit der zugrundeliegenden Wildtypfunktion beruhen könnte.

6. Zusammenfassung

Der Mutationsort von H2 ts206 wurde mit Hilfe von Marker-Rescue-Transfektionsexperimenten einem Bereich auf dem viralen Genom zwischen der BamHI-Schnittstelle bei Position 29,3 und der HindIII-Schnittstelle bei Position 31,7 zugeordnet.
Virale Funktionen, die dort kodieren, sind das E2B-Transkript für das 87K-Protein, das L1-Transkript aus der EL-Region und die beiden kleinen virusassoziierten RNAs VAI und VAII.
In verschiedenen Ansätzen zur Hybridisierung viraler Wildtyp-DNA und mutantespezifischer RNA präsentierte sich als Folge der so lokalisierten Mutation ein überraschender Phänotyp für H2 ts206:
Zusammen mit einer übernormal hohen Menge virusspezifischer RNA im Kern infizierter Zellen erschien nur eine stark verminderte Menge mutantespezifische RNA im Zytoplasma dieser Zellen.
Beide quantitativen Erscheinungsbilder des Mutante-Phänotyps konnten in Bezug auf den genomischen Ursprung der erfassten RNA-Mengen genauer festgelegt werden.
Hybridisierungen markierter RNA gegen getrennte filtergebundene Wildtyp-DNA-Fragmente wiesen die grosse Menge mutantespezifischer nuklearer Transkripte als komplementär zum gesamten Bereich des Ad 2 Genoms aus. In Parallelansätzen deckte die Gleichgewichtsmenge wildtypspezifischer RNA aus dem Kern infizierter Zellen -bei gleicher Hybridisierungsintensität- nur etwa 2/3 bis 3/4 des viralen Genoms ab.
Als weiteres Charakteristikum für den Mutante-Phänotyp zeigte sich, daß die geringe Menge mutante-

spezifischer RNA,die ins Zytoplasma entlassen wird, komplementär ist zu nur 2 von 6 frühen Regionen auf dem viralen Genom:Der E1 und der EL Region,die nacheinander als erste virale Regionen ,ungefähr ein bis zwei Stunden nach Infektion,exprimiert werden. Danach treten offenbar,als Folge der ts206 Mutation, keine weiteren viralen mRNA-Transkripte mehr im Zytoplasma auf,während gleichzeitig nukleare Transkripte akkumulieren.
Versuche mit Proteinsyntheseinhibitoren,wie sie in verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, zeitigten ein ähnliches Erscheinungsbild.
Es ist also anzunehmen,daß auch bei H2 ts206 ein nicht funktionelles virales Protein diesen Phänotyp bedingt(der Effekt ist hier nur deutlicher,wohl weil von wesentlich niedrigeren Multiplizitäten der Infektion ausgegangen wurde).
Von den drei angeführten viralen Funktionen am Mutationsort kommt das E2B-Transkript für den ts206 Phänotyp schon deshalb nicht als verantwortlich in Frage,weil es erst viel später als die Mutation im viralen Infektionszyklus exprimiert wird.Die VA RNAs üben ihre Wirkung nicht über Translationsprodukte aus,und sind wohl schon deshalb in diesem Zusammenhang ohne Bedeutung.Außerdem scheinen sie, wie in jüngster Zeit nachgewiesen wurde,eine Funktion bei der viralen Translation zu haben.
Die dritte Funktion am Mutationsort bleibt als die wahrscheinlich verantwortliche für den H2 ts206 Phänotyp:Die EL-Region,daraus das frühe L1-Transkript. Es wird sehr früh im viralen Infektionszyklus exprimiert, und kodiert für mindestens zwei Proteine(52,55K), aber es konnte ihm bis jetzt keine Funktion zuge-

ordnet werden.Die Ergebnisse dér vorliégenden Arbeit legen nahe,daß diese Region verantwortlich ist für den Transport aller frühen viralen Transkripte, die nach der EL-Region zur Expression kommen. Es kann nicht ausgeschlossen werden,daß dieser virusspezifische Transportdefekt -über eine mehr oder weniger enge Koppelung- seine Ursache hat in einem defekten Spleissvorgang an entsprechenden viralen Präkursoren.

7. Literaturverzeichnis

Abelson,J.(1979).RNA processing and the intervening sequence problem.Ann.Rev.Biochem. 48,1035-1069

Akusjärvi,G.,Mathews,M.B.,Anderson,P.,Vennström,B. and Pettersson,U.(1980).Structure of genes for virus-associated RNA_I and RNA_{II} of adenovirus type 2. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77,2424-2428

Akusjärvi,G. and Persson,H.(1981).Controls of RNA splicing and termination in the major late adenovirus transcription unit.Nature 292,420-426

Anziano,P.,Hanson,D.K.,Mahler,H.R. and Perlman,P.S.(1982). Functional domains in introns:trans acting and cis acting regions of intron 4 of the cob gene. Cell 30,925-932

Babich,A.,Nevins,J.R. and Darnell,J.E.jr.(1980).Early capping of transcripts from the adenovirus major late transcription unit.Nature 287,246-248

Babich,A. and Nevins,J.R.(1981).The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72kd DNA binding protein.Cell 26,371-379

Benoist,C.,O'Hare,K.,Breathnach,R. and Chambon,P.(1980). The ovalbumin gene - sequence of putative control regions.Nucl.Acid Res. 8,127-142

Berget,S.M.,Moore,C. and Sharp,P.A.(1977).Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus late mRNA.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74,3171-3175

Berk,A.,Lee,F.,Harrison,T.,Williams,T. and Sharp,P.A. (1979).Preearly adenovirus 5 gene product regulates the synthesis of early viral messenger RNAs.Cell 17,935-944

Bernardi,G.(1971).Chromatography of nucleic acids on hydroxy-apatite columns.In Procedure in Nucleic Acid Research,VolII,455-465,Cautrin,G.L. and Davies,D.R.(eds.)

Bertrand,H.,Bridge,P.,Collins,R.A.,Carriga,G. and Lambiwitz, A.M.(1982).RNA splicing in neurospora mitochondria. Characterization of new nuclear mutants with defects in splicing the mitochondrial large rRNA. Cell 29,517-526

Blanchard,J.-M.,Weber,J.,Jelinek,W. and Darnell,J.E.(1978). In vitro RNA-RNA splicing in adenovirus 2 mRNA formation.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75,5344-5348

Borst,P. and Grivell,L.A.(1981a).One gene's intron is another gene's exon.Nature 289,439-440

Borst,P. and Grivell,L.A.(1981b).Small is beautiful - portrait of a mitochondrial genome. Nature 290,443-444

Breathnach,R. and Chambon,P.(1981).Organization of eukaryotic split genes coding for proteins. Ann.Rev.Biochem. 50,349-383

Broker,T.R. and Chow,L.T.(1979).Alternative RNA splicing pattern and the clustered transcription and splicing signals of human adenovirus 2.In Eukaryotic Gene Regulation,611-637.Axel,R.,Maniatis,T. and Fox,C.F. (eds.).ICN-UCLA,Symposium on Molecular and Cellular Biology 14,Academic Press,New York

Busslinger,M.,Moschonas,N. and Flavell,R.A.(1981). β^+ Thalassemia:Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron.Cell 27,289-298

Canaani,D.,Kahana,C.,Lavi,S. and Groner,Y.(1979). Identification and mapping of N^6-methyladenosine containing sequences in Simian Virus 40 RNA. Nucl.Acids Research 6,2879-2899

Carusi,E.A.(1977).Evidence of blocked 5'-termini in human Adenovirus DNA.Virology 76,380-394

Cech,T.R.,Zaug,A.J.,Grabowski,P.J. and Brehm,S.L.(1982). Transcription and splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena.In the Cell Nukleus 10, Busch,H. and Rothblum,L.(eds.),Academic Press,N.Y., pp 171-204

Celma,M.,Pan,J. and Weissman,S.(1977).Studies of low molecular weight RNA from cells infected with Adenovirus 2.J.Biol.Chem.252,9032-9042

Chardonnet,Y. and Dales,S.(1973).Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa-cells.IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. Virology 56,465-483

Chen-Kiang,S.,Nevins,J.R. and Darnell,J.E.jr.(1979). N^6-methyladenosine in adenovirus type 2 nuclear RNA is conserved in the formation of messenger RNA. J.Mol.Biol. 135,733-752

Chinnadurai,G.Chinnadurai,S. and Brusca,J.(1979).Physical mapping of a large plaque mutation of adenovirus type 2.J.Virol. 32,632-628

Chow,L.T.,Gelinas,R.E.,Broker,T.R. and Roberts J.R.(1977). An amazing sequence arrangement at the 5'-ends of adenovirus 2 messenger RNA.Cell 12,1-8

Chow,L.T.,Broker,T.R. and Lewis,J.B.(1979).Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2.J.Mol.Biol. 134,265-303

Craig,E.A. and Raskas,H.J.(1974).Effect of cycloheximide on RNA metabolism in early productive infection with adenovirus 2.J.Virol. 14,26-32

Chu,G. and Sharp,P.A.(1981).A gene chimaera of SV40 and mouse ß-globin is transcribed and properly spliced. Nature 289,378-382

Derman,E.,Krauter,K.,Walling,L.,Weinberger,C.,Ray,M. and Darnell,J.E.jr.(1981).Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. Cell 23,731-739

Dimock,K. and Stoltzfus,C.M.(1978).Cycloleucine blocks 5'-terminal and internal methylations of Avian Sarcoma Virus genome RNA.Biochemistry 17,3627-3632

Dobkin,C.,Pergolizzi,R.G.,Bahre,P. and Bank,A.(1983). Abnormal splice in a mutant human ß-globin gene not at the site of a mutation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80,1184-1188

Dulbecco,R. and Freeman,G.(1959).Plaque production by the polyoma virus.Virology 8,396-397

Dunn,A.R. and Hussell,J.A.(1977).A novel method to map transcripts:evidence for homology between an adenovirus mRNA and discrete multiple regions of the viral genome.Cell 12,23-36

Efstradiatis,A.,Posakony,J.W.,Maniatis,T.,Lawn,R.M., O'Connell,C.,Spritz,R.A.,DeRiel,J.K.,Forget,B.G., Weissman,S.M.,Slighton,J.L.,Blechl,A.E.,Smithies,O., Baralle,F.E.,Shoulders,C.C. and Proudfoot,N.J.(1980). The structure and evolution of the human ß-globin gene family.Cell 21,653-668

Eggerding,F. and Raskas,H.J.(1978).Effect of protein synthesis inhibitors on viral mRNA synthesized early in adenovirus type 2 infection.J.Virol.25,453-458

Fowlkes,D.M. and Shenk,T.(1980).Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. Cell 22,405-413

Fraser,N. and Ziff,E.(1978).RNA structures near poly(A) of adenovirus 2 late messenger RNAs. J.Mol.Biol. 124,27-51

Friefeld,B.R.,Lichy,J.H.,Hurwitz,J.,Horwitz,M.S.(1983). Evidence for an altered adenovirus DNA polymerase in cells infected with a mutant H5 ts149. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80, 1589-1593

Frost,E. and Williams,J.(1978).Mapping temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue.Virology 91,39-50

Fütterer,J.(1978).DNA-Proteinkomplexe in adenovirus-infizierten HeLa-Zellen.Diplomarbeit, Universität München

Fukumaki,Y.,Ghosh,P.K.,Benz,J.E.,Reddy,V.B.,Lebowitz,P., Forget,B.G. and Weissman,S.M.(1982).Abnormally spliced messenger RNA in erythoid cells from patients with ß$^{+}$Thalassemia and monkey cells expressing a cloned ß$^{+}$thalassemic gene.Cell 28,585-593

Galos,R.S.,Williams,J.,Binger,M.-H. and Flint,J.S.(1979). Location of additional early gene sequences in the adenovirus chromosome.Cell 17,945-956

Gingeras,T.R.,Sciaky,D.,Gelinas,R.E.,Bing-Dong,J.,Yen,C.E., Kelly,M.M.,Bullock,P.A.,Parsons,B.L.,O'Neill,K. and Roberts,J.R.(1982).Nukleotide sequences from the adenovirus 2 genome.J.Biol.Chem. 22,13475-13491

Goldberg,M.(1979).Dissertation,Stanford University, Stanford,CA

Graham,F.L. and van der Eb,A.J.(1973).A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus type 5 DNA.Virology 52,456-467

Green,M. and Pina,M.(1964).Biochemical studies on adenovirus multiplication.VI.Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNAs. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 51,1251-1259

Green,M.,Fujinaga,K. and Pina,M.(1969).Use of DNA-RNA and DNA-DNA hybridization on nitrocellulose membranes in virus research.In Fundamental Techniques in Virology,Habel,K. and Salzman,N.P.(eds),Academic Press,N.Y. and London

Green,M.(1970).Oncogenic viruses. Ann.Rev.Biochem. 39,701-756

Green,M.,Mackey,J.K.,Wold,W.S.M. and Rigden,P.(1979). Thirty-one human adenovirussserotypes(Ad 1-31) form 5 groups (A-E) based upon genome homologies. Virology 93,481-492

Greene,P.J.,Heyneker,F.,Bolivar,F.,Rodriguez,R.L.,Betlach,M.C., Covarrubias,A.A.,Backman,K.,Russel,D.J.,Tait,R. and Boyer,H.W.(1978).A general method for the purification of restriction enzymes.Nucl.Acids Res. 5,2373-2380

Greer,C.L.,Peebles,C.L.,Gegenheimer,P. and Abelson,J.(1983). Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing.Cell 32,537-546

Guthrie,C. and Abelson,J.(1982).Organization and expression of tRNA genes in saccharomyces cerevisiae.In the Molecular Biology of the yeast saccharomyces. Metabolism and Gene Expression.Strathern,J.E., Jones,E.W. and Broach,J.R.(eds.)CHS N.Y., CHS Laboratory,in press

Hamer,D.H. and Leder,P.(1979).Splicing and the formation of stable RNA.Cell 18,1299-1302

Hamer,D.H.,Smith,K.D.,Boyer,S.H. and Leder,P.(1979). SV40 recombinants carrying rabbit ß-globin gene coding sequences.Cell 17,725-735

Hen,R.,Sassone-Corsi,P.,Corden,J.,Gaub,M.P. and Chambon,P. (1982).Sequences upstream from the TATA box are required in vivo and in vitro for efficient transcription from the adenovirus serotype 2 major late promoter.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79,7132-7136

Hofer,E. and Darnell,J.E.jr.(1981).The primary transcription unit of the mouse ß-globin gene.Cell 23,585-593

Hübner,J.R.(1967).Adenovirus-directed tumor and T-antigens. In Perspectives in Virology 5,Pollard,M.(ed.), Academic Press,N.Y.,147-166

Jones,N. and Shenk,T.(1979).An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76,3665-3669

Kathmann,H.-P.(1974).Isolation von temperatursensitiven Mutanten von Adenovirus Typ 2.Diplomarbeit, Universität Köln

Kathmann,H.-P.,Schick,J.,Winnacker,E.L. and Dörfler,W.(1976). Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 2. J.Virol. 19,43-53

Kinnigburgh,A.J.,Mertz,J.E. and Ross,J.(1978).The precursor of mouse ß-globin messenger RNA contains two intervening RNA sequences.Cell 14,681-693

Klessig,D.F.(1977).Two adenovirus mRNAs have a common 5'-terminal leader sequence encoded at least 10kb upstream from their main coding regions. Cell 12,9-21

Klessig,D.F. and Chow,L.(1980).Incomplete splicing and defective accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected by human adenovirus type 2. J.Mol.Biol. 139,221-242

Knapp,G.,Beckman,J.S.,Johnson,P.F.,Furhman,S.A. and Abelson,J. (1978).Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes.Cell 14,221-236

Kruger,K.,Grabowski,P.J.,Zaug,A.J.,Sands,J.,Gottschling,D.E. and Cech,T.R.(1982).Selfsplicing RNA:Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena.Cell 31,147-157

Lerner,M.,Boyle,J.A.,Mount,S.M.,Wolin,S.L. and Steitz,J.A. (1979).Are snRNPs involved in splicing? Nature 283,220-224

Levine,A.J. and Ginsberg,W.S.(1967).Mechanism by which fibre antigen inhibits multiplication of type 5 adenovirus.J.Virol. 1,747-757

Lewin,B.(1980).Alternatives for splicing:Recognizing the ends of introns.Cell 22,324-326

Lewis,J.B.,Anderson,C.W. and Atkins,J.F.(1977).Further mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization to specific DNA fragments.Cell 12,37-44

Lewis,J.B. and Mathews,M.B.(1980).Control of adenovirus early gene expression:a class of immediate early products.Cell 21,303-313

Lorberg-Holm,K. and Philipson,L.(1969).Early events of virus infection in an adenovirus system. J.Virol. 4,323-338

Luftig,R.B., and WEihing,R.R.(1975).Adenovirus binds to rat brain microtubules in vitro.J.Virol. 16,696-706

Mackey,J.K.,Brackmann,K.H.,Green,M.R. and Green,M.(1977). Preparation and characterization of highly radioactive in vitro labeled adenovirus DNA and DNA restriction fragments.Biochemistry 16,4478-4483

Maniatis,T.,Fritsch,E.F. and Sambrook,J.(1982).Molecular cloning(a laboratory manual).CSH,CSH Laboratory

Manley,J.L.,Sharp,P.A. and Gefter,M.L.(1979).RNA synthesis in isolated nuclei:in vitro initiation of adenovirus 2 major late mRNA precursor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76,160-164

Mathews,M.B. and Pettersson,U.(1978).The low molecular weight RNAs of adenovirus 2 infected cells. J.Mol.Biol. 119,293-328

Mathews,M.B.(1980).Binding of adenovirus VA RNA to mRNA: a possible role in splicing.Nature 285,575-577

Maxam,A.M. and Gilbert,W.(1977).A new method for sequencing DNA.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 560-564

McMaster,G.K. and Carmichael,G.C.(1977).Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridin orange.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74,4835-4838

Miles,B.D.,Luftig,R.B.,Weatherbee,J.A.,Weihing,R.R. and Weber,J.(1980).Quantitation of the interaction between adenovirus type 2 and 5 and microtubules inside infected cells.Virology 105,265-269

Montell,C.,Fisher,E.F.,Carruthers,M.H. and Berk,A.J.(1982). Resolving the functions of overlapping viral genes by site specific mutagenesis at a mRNA splice site. Nature 295,380-384

Naora,H. and Deacon,N.J.(1982).Relationship between the total size of exons and introns in protein coding genes of higher eukaryotes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79,6196-6200

Nevins,J.R.,Ginsberg,N.S.,Blanchard,J.M.,Wilson,M.C. and Darnell,J.E.(1979).Regulation of the primary expression of early adenovirus transcription units. J.Virol. 32,727-733

Nevins,J.R. and Wilson,M.C.(1981).Regulation of adenovirus 2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing. Nature 290,113-119

Nevins,J.R.(1981).Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. Cell 26,213-220

Nevins,J.R. and Chen-Kiang,S.(1981).Processing of adenovirus nuclear RNA to mRNA.In Advances in Virus Research 26,1-35,Lauffer,M.A.,Bang,F.B.,Maramorosch,K and Smith,K.M.,Academic Press,N.Y.

Nevins,J.R.(1982).Induction of the synthesis of a 70kd mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product.Cell 29,913-919

O'Farrell,P.Z.,Cordell,B.,Valenzuela,P.,Rutter,W.J. and Goodman,H.M.(1978).Structure and processing of yeast precursor tRNAs containing intervening sequences.Nature 274,438-445

Ortin,J. and Dörfler,W.(1975).Transcription of the genome of adenovirus type 12.I.Viral mRNA in abortively infected and transformed cells.J.Virol. 15,27-35

Parsons,J.T. and Green,M.(1971).Biochemical studies of adenovirus multiplication XVIII.Resolution of early virus-specific RNA species in adenovirus 2 infected and transformed cells.Virology 45,154-162

Peebles,G.L.,Gegenheimer,P. and Abelson,J.(1983). Precise excision of intervening sequences from precursor tRNAs by a membrane-associated yeast endonuklease.Cell 32,525-536

Penman,S.(1966).RNA metabolism in the HeLa cell nukleus. J.Mol.Biol. 17,117-130

Persson,H.,Monstein,H.-J.,Akusjärvi,G. and Philipson,L. (1981).Adenovirus early gene products may control viral mRNA accumulation and translation in vivo. Cell 23,485-496

Persson,H. and Philipson,L.(1981).Regulation of adenovirus gene expression. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 97,157-230

Philipson,L.,Pettersson,U. and Lindberg,U.(1975). Molecular biology of adenoviruses.In Virology Monographs 14,Gard,S. and Hallaver,C.(eds.),1-115

Pina,M. and Green,M.(1965).Biochemical studies on adenovirus multiplication.IX.Chemical and base composition anlysis of 28 human adenoviruses. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 54,547-551

Pribnow,D.(1979).In Biological Regulation and Development I, Goldberger,R.(ed.),Plenum,N.Y.,219-277

Proudfoot,N.J. and Brownlee,G.G.(1976).3'-Noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature 263,211-214

Reed,R.E.,Baer,M.F.,Guerrier-Takada,C.,Donis-Keller,H. and Altman,S.(1982).Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit (M1 RNA) of Ribonuclease P from Escherichia coli.Cell 30,627-636

Rekosh,D.,Russell,W.C.,Bellet,A.J.D. and Robinson,A.J.(1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA.Cell 11,283-295

Rigby,P.W.J.,Dieckmann,M.,Rhodes,C. and Berg,P.(1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nicktranslation with DNA Polymerase I.J.Mol. Biol. 113,237-251

Rozek,C.E. and Davidson,N.(1983).Drosohila has one myosin heavy chain with three developmentally regulated transcripts.Cell 32,23-34

Schibler,U.,Kelley,D.E. and Perry,R.P.(1977).Comparison of methylated sequences in messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA from mouse L cells. J.Mol.Biol. 115,695-714

Schmelzer,C. and Schweyen,R.J.(1982).Evidence for ribosomes involved in splicing of yeast mitochondrial transcripts.Nucl.Acids Res. 10,513-524

Segal,S.,Levine,A.J. and Khoury,G.(1979).Evidence for non spliced SV40 RNA in undifferentiated terato-carcinoma stem cells.Nature 280,335-338

Sergeant,A.,Tigges,M.A. and Raskas,H.J.(1979).Nucleosome like structural subunits of intranuclear parental adenovirus type 2 DNA.J.Virol. 29,888-898

Sharp,P.A.,Moore,C. and Haverty,J.L.(1976).The infectivity of adenovirus 5 DNA-protein-complex. Virology 75,442-456

Sharp,P.A.(1981).Speculations on RNA splicing. Cell 23,643-646

Shatkin,A.J.(1976).Capping of eukaryote mRNAs. Cell 9,645-653

Shenk,T.,Jones,N.,Colloy,W. and Fowlkes,D.(1979). Functional analysis of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells.Cold Spring Harbor Symp.Quant. Biol. 44,367-375

Smith,K. and Lingrel,J.B.(1978).Sequence organization of the ß-globin mRNA precursor. Nucl.Acids Res. 5,3295-3302

Söderlund,H.,Pettersson,U.,Vennström,B.,Philipson,L. and Mathews,M.B.(1976).A new species of viruscoded low molecular weight RNA from cells infected with adenovirus type 2.Cell 7,585-593

Southern,E.M.(1975).Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98,503-517

Spradling,A.C.,Digan,M.E. and Mahowald,A.P.(1980). Two clusters of genes for major chorion proteins of Drosophila melanogaster.Cell 19,905-914

Stillman,B.W.,Tamanoi,F. and Mathews,M.B.(1982). Purification of an adenovirus-coded DNA polymerase that is required for initiation of DNA replication. Cell 31,613-623

Stow,N.D. and Wilkie,N.M.(1976).An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type 1 DNA.J.Gen.Virol. 33,447-458

Svensson,U.,Persson,R. and Everitt,E.(1981).Virus-receptor interaction in the adenovirus-system.I.Identification of virion attachment proteins of the HeLa cell plasma membrane.J.Virol. 38,70-81

Tate,V. and Philipson,L.(1979).Parental adenovirus DNA accumulation in nucleosome-like structures in infected cells.Nucl.Acids Res. 6,2769-2785

Teifel,J.(1976).Dissertation,Universität München

Thimmappaya,B.,Weinberger,C.,Schneider,R.J. and Shenk,T. (1982).Adenovirus VAI RNA is required for efficient Translation of viral mRNAs at late times after infection.Cell 31,543-551

Thomas,P.S.(1980).Hybridization of denatured RNA and small fragments transfered to nitrocellulose. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77,5201-5205

Tibbetts,C.,Johansson,K. and Philipson,L.(1973). Hydroxyapatite chromatopraphy and formamide denaturation of adenovirus DNA.J.Virol. 12,218-225

Tilghman,S.M.,Curing,P.J.,Tiemeier,D.C.,Leder,P. and Weissman,C.(1978).The intervening sequence of a mouse ß-globin gene is transcribed within the 15S ß-globin mRNA precursor.Proc.Natl.Acad.Sci.USA Proc.Acad.Sci.USA 75,1309-1313

Treisman,R.,Proudfoot,N.J.,Shander,M. and Maniatis,T. (1982).A single-base change at a splice site in a $ß^{o}$-thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. Cell 29,903-911

Tuszynski,G.P.,Knight,L.,Pipemo,J.R. and Walsh,P.N.(1980). A rapid method for removal of (^{125}J)-iodide following iodination of protein solutions. Anal.Biochem. 106,118-122

Ullrich,K.(1979).Rekombinationsprozesse zwischen Virus-DNS und Restriktionsfragmenten in adenovirus-infizierten HeLa-Zellen.Diplomarbeit,Universität München

Vogt,V.M.(1973).Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from Aspergillus oryzae.Eur.J.Biochem. 33,192-200

Wei,C.M.,Gershowitz,A. and Moss,B.(1976).5'-terminal and internal methylated nucleotide sequences in HeLa-cell mRNA.Biochemistry 15,397-401

Wilson,M.C.,Nevins,J.R.,Blanchard,J.M.,Ginsberg,H.S. and Darnell,J.E.jr.(1979).The metabolism of mRNA from the transforming region of adenovirus type 2.Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 44,447-455

Winnacker,E.-L.(1975).Adenovirus type 2 DNA Replication. I.Evidence for discontinuous DNA Synthesis. J.Virol. 15,744-758

Winnacker,E.-L.(1983).Replication of adenovirus DNA. Curr.Topics Microbiol.Immunol.in press,W.Dörfler(ed.), Springer Verlag Berlin,Heidelberg,New York

Winocour,E.(1963).Purification of polyomavirus . Virology 19,158-168

Wold,W.S.M.,Green,M. and Büttner,W.(1978).Adenoviruses. In The Molecular Biology of Animal Viruses,637-768, Nayah,D.P.(ed.),Marel Dekker,New York

Wu,G.J.(1978).Adenovirus-directed transcription of 5,5S RNA in vitro.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75,2175-2179

Yang,V.W.,Lerner,M.R.,Steitz,J.A. and Flint,S.J.(1981). A small ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78,1371-1375

Zeevi,M.,Nevins,J.R. and Darnell,J.E.jr.(1981).Nuclear RNA is spliced in the absence of poly(A)addition. Cell 26,39-46

Ziff,E.B.(1980).Transcription and RNA processing by the DNA Tumor Viruses.Nature 287,491-498

Zimmermann,S.B. and Sandeen,M.(1966).The ribonuclease activity of crystallized pancreatic deoxyribonuclease.Anal.Biochem. 14,269-277

Die vorliegende Arbeit wurde von März 1979
bis Oktober 1982 am Institut für Biochemie
der Universität München unter Leitung von
Herrn Prof.Dr. E.-L. Winnacker durchgeführt.

Herrn Prof.Dr. Winnacker danke ich für die
Unterstützung,die er dieser Arbeit zuteil
werden ließ,sowie für Vieles,das ich lernen
konnte in dieser Zeit.

Frau Ilse Pfitzinger und Frau Regina Viktoratos
danke ich für ihre Mithilfe bei vielen
Plaquetests,Frau Pfitzinger besonders für
ihre Mitarbeit bei Marker-Rescue-Versuchen.

Herrn Christian Meinschad danke ich
für die radioaktive DNA in unseren
Southern/Northern-Blot-Ansätzen.

Herrn Dr. Horst Ibelgaufts danke ich für die
ständig und freundlich gewährte Gelegenheit
zur Einsichtnahme seiner "Bibel" und
anderer Literaturvorlagen.

Frau Sonja Pregler und Herrn Dr. Johannes Fütterer
danke ich für ihre freundschaftliche Hilfe
bei der Erstellung der Reinschrift zu dieser
Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern
des Arbeitskreises für ihre ständige
Hilfsbereitschaft bedanken.

Lebenslauf

Name	Karin Ullrich
Geburtsdatum	31. 8. 1953
Geburtsort	Freiburg/Breisgau
Eltern	Albert Ullrich, Dipl.-Ing. Gisela Ullrich, geb. Ebinger, Hausfrau
1959-1963	Volksschule, München
1963-1969	Gymnasium, München
1969-1972	Gymnasium, Darmstadt
1972	Abitur
WS 1973/74	Beginn des Biologiestudiums an der TH Darmstadt
1975	Diplomvorprüfung
1975	Beginn des 2. Studienabschnitts an der Universität München
1977	Diplomhauptprüfung
Dez. 1977 bis Febr. 1979	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof.Dr. E.-L. Winnacker am Institut für Biochemie der Universität München
März 1979 bis Okt. 1982	Doktorarbeit am selben Institut